Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
- Lehrstuhl II -
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

# INDUKTION DER FREISETZUNGSREAKTION UND HEMMUNG DER 5-HT-AUFNAHME IN MENSCHLICHE THROMBOZYTEN DURCH AMINOADAMANTANE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GABRIELE MUSCHALEK
aus Bochum

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
- Lehrstuhl II -
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

# INDUKTION DER FREISETZUNGSREAKTION UND HEMMUNG DER 5-HT-AUFNAHME IN MENSCHLICHE THROMBOZYTEN DURCH AMINOADAMANTANE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

GABRIELE MUSCHALEK

aus Bochum

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Marburg am 27. Januar 1978

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Wesemann

Correferent: Prof. Dr. med. R. Egbring

## Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| D 1 | 1-Aminoadamantan |
| D 145 | 1-Amino-3.5-dimethyladamantan |
| D 176 | 1-Amino-3- methyladamantan |
| D 177 | 1-Amino-3-isopropyladamantan |
| D 178 | 1-Amino-3-butyladamantan |
| 5-HT | 5-Hydroxytryptamin, Serotonin |
| PCA | Perchlorsäure |
| PEP | Phosphoenolpyruvat |
| PK | Pyruvatkinase |
| PRP | Plättchen reiches Plasma |
| RHS | Retikulo-histiocytäres System |
| $s_{\bar{x}}$ | Standardfehler des arithmetischen Mittels |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| ZpM | Zerfälle pro Minute |

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG 1

B. METHODEN 11

I. Chemikalien 11

II. Gewinnung menschlicher Thrombozyten und Meßmethodik

1. Versuchspersonen 11

2. Gewinnung des Plättchen reichen Plasmas 12

3. Herstellung der Thrombozytensuspension und Inkubation 12

4. Thrombozytenzählung 13

5. Bestimmung der Serotoninfreisetzung bzw. Aufnahme mittels radioaktiv markiertem ($^{14}C$) 5-Hydroxytryptamin (5-HT) 14

6. ATP/ADP-Bestimmung 15

6.1 Vorbehandlung der Proben 15

6.2 Ansatz der Eichkurve 16

6.3 Umsetzung mit Pyruvatkinase 18

6.4 Extraktion des Luciferin-Luciferase-Systems 19

6.5 ATP/ADP-Messung 20

7. Ansatz der Pufferlösungen 20

III. Spezielle Versuchsanordnungen 21

1. Induktion der Freisetzungsreaktion 21

1.1 Abhängigkeit der Freisetzungsreaktion von der molaren Konzentration der Aminoadamantan derivate 21

1.2 Zeitabhängigkeit der Freisetzungsreaktion 22
1.3 Temperaturabhängigkeit der Freisetzungsreaktion 22
2. Zeitabhängigkeit der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme 22
3. Konzentrationsabhängigkeit der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme 23
4. Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme 23
5. Untersuchungen zur Hemmung der Glykolyse und der Atmungskette 24
6. LDH-Bestimmung 25
7. Elektronenmikroskopie 25
ANHANG: Berechnung 27

C. ERGEBNISSE 30
1. Konzentrationsabhängigkeit der Aminoadamantan-induzierten Freisetzung aus menschlichen Thrombozyten 30
1.1 Freisetzung durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) 30
1.2 Freisetzung durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) 31
2. Induktion der Freisetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Zeit 33
2.1 Zeitabhängigkeit der Freisetzungsreaktion durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) 33
2.2 Zeitabhängigkeit der Freisetzungsreaktion durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) 34

3. Induktion der Freisetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Temperatur 36

4. Gesamtgehalt menschlicher Thrombozyten an ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP 38

5. Zeitabhängigkeit der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme menschlicher Thrombozyten 40

6. Kinetik der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme 41

7. Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme in menschliche Thrombozyten 43

7.1 Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) 43

7.2 Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) 46

8. Untersuchungen zur Hemmung der Glykolyse und des Elektronentransportes 48

9. Lactatdehydrogenase-Messung 51

10. Elektronenmikroskopie 52

D. DISKUSSION 56

E. ZUSAMMENFASSUNG 74

F. LITERATUR 77

## A. EINLEITUNG

Thrombozyten zeigen hinsichtlich der Ausschüttung, Aufnahme und Speicherung biogener Amine gewisse Ähnlichkeiten mit Nervenendigungen des ZNS und werden deshalb als Modellzelle für Synaptosomen und Untersuchungen über Neurotransmitter, sowie den Einfluß von Psychopharmaka angesehen (PAASONEN, 1971). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von 1-Aminoadamantanen, die in den Nervenendigungen des ZNS die Aufnahme, Speicherung und Freisetzung des 5-Hydroxytrypamins (5-HT) beeinflussen können, auf menschliche Thrombozyten untersucht. Diese Untersuchungen sollen einen Beitrag zum Wirkungsmechanismus der 1-Aminoadamantane leisten und der Klärung der Frage dienen, ob die Thrombozyten auch hinsichtlich der 1-Aminoadamantanwirkung als leicht zugängliches Modellsystem für Nervenendigungen verwandt werden können.

1-Aminoadamantan, die Muttersubstanz der in dieser Arbeit untersuchten Derivate 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178), ist ein stabiles, farbloses, kristallines Amin mit ungewöhnlicher symmetrischer Struktur (Abb. 1). Es hat antivirale Wirksamkeit, wobei es die Viruspenetration in die Zelle hemmt (DAVIES et al., 1964;

GALBRAIGHT et al., 1969; MAASSAB, 1964). Medizinisch wird es bei der Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt (SCHWAB et al., 1969), besonders bei L-Dopa-refraktären Fällen bzw. in der Konbination Aminoadamantan/L-Dopa bei der Behandlung akinetischer Krisen (DANIELCZYK, 1973). Die therapeutische Wirkung des 1-Aminoadamantans soll auf einer Erhöhung der Dopaminsynthese und dessen Freisetzung in den Basalganglien beruhen (GRELAK et al., 1970; SCATTON et al., 1970).

Als Entdecker der Thrombozyten gilt DONNÉ (1842), der sie "Globuline" nannte; wenig später wurden sie auch von ZIMMERMANN (1847) gesehen und als "Elementarbläschen" bezeichnet. Die Eigenständigkeit dieser Blutteilchen wurde 1847 von OSLER erkannt, der sie als die "dritten geformten Blutelemente" neben Erythrozyten und Leukozyten bezeichnete. Bei den in den folgenden Jahren durchgeführten ersten wissenschaftlichen Untersuchungen über die Blutgerinnung wurde mehr über die Rolle der Thrombozyten bekannt. So erkannte BIZZOZERO (1882), daß die Adhäsion von Thrombozyten an eine verletzte Gefäßwandstelle den ersten Schritt zur Bildung eines Thrombus darstellt. Den bleibenden Namen "Thrombozyten" erhielten die Teilchen 1901 von DEKHUYZEN. Zum Teil werden sie im Deutschen auch nach dem englischen "blood platelets"

Plättchen genannt.

Thrombozyten sind beim Menschen kernlose, scheibchenförmige Blutteilchen mit einer Größe von 1-3 µ; in 1 $mm^3$ Blut sind etwa 200.000 Thrombozyten enthalten. Sie entstammen dem Knochenmark, wo sie durch den Zerfall von Megakaryozyten entstehen; dabei zerfällt ein Megakaryozyt durch Bildung demarkierender Membranen in ca 2.000 Thrombozyten, der zurückbleibende polyploide Kern wird von Zellen des RHS phagozytiert (PIPER, 1974). Die Zeit der Organellenbildung und Reifung im Knochenmark, von der angenommen wird, daß sie über bisher unbekannte Thrombopoietine stimuliert wird, benötigt etwa 7 Tage; die Lebensdauer in der Blutbahn beträgt 8-10 Tage. Die alternden Plättchen werden in der Milz abgefangen und abgebaut. Ihre Hauptfunktion erfüllen die Thrombozyten bei der Blutgerinnung; außerdem können sie Bakterien und Fremdpartikel phagozytieren (EDER und GEDIGK, 1973).

Lichtmikroskopisch läßt sich an den Thrombozyten Hyalomer und Granulomer unterscheiden. Die Erforschung ihrer Ultrastruktur begann 1939 mit den ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen von WOLPERS und RUSKA. Die Form der Thrombozyten ist nicht konstant, sondern unter anderem abhängig

von der Temperatur, vom Oberflächenkontakt und auch vom zeitlichen Stadium der Aggregation (REBUCK et al., 1961). Erfolgt die Fixation frischer Thrombozyten mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid im Blutplasma, zeigen sie eine diskoide Form, oft mit zytoplasmatischen pseudopodienartigen Ausläufern. Im Plättcheninneren, der sog. Sol/Gel-Zone finden sich fibröse Elemente, die zum Großteil aus dem kontraktilen Protein Thrombosthenin bestehen und für die Plättchenkontraktion und damit die Retraktion von Blutgerinnseln verantwortlich sein dürften (PIPER, 1974). In dieser Sol/Gel-Zone liegen auch die Thrombozytenorganellen, z.B. der Golgi-Apparat und die auffallend kleinen Mitochondrien mit wenig Cristae; ca 30 nm große Glykogenschollen dienen als Energiespeicher. Außerdem zeigen sich Vakuolen, die über ein mit der Zelloberfläche in Verbindung stehendes Kanälchensystem nach außen münden und so zusammen ein zelluläres Transportsystem bilden (BEHNKE, 1967). Die äußere Zellmembran ist dreischichtig, ca 8 nm dick; im submembranen Raum liegende Mikrotubuli sind anscheinend an der Aufrechterhaltung der Zellform, sowie bei der Aggregation beteiligt. Im Plättcheninneren liegen neben den Zellorganellen 200-300 nm große, osmiophile Granula, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Sie enthalten hydrolytische Enzyme (DAY et al., 1969). Daneben finden sich ebenfalls osmio-

phile Granula von etwas gerigerer Größe (100-230 nm), die nur von einer Einfachmembran umgeben sind und "very dense bodies" genannt werden. Sie enthalten Serotonin (5-HT), Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) (TRANZER et al., 1967; DA PRADA et al., 1968, 1972). Dabei sollen 5-HT und ATP dort in einer Relation von 2-3 : 1 in Form von Micellen mit hohem Molekulargewicht gespeichert sein (BERNEIS et al., 1969).

Auf Grund der Arbeiten von BORN (1956) ist bekannt, daß Thrombozyten einen hohen Gehalt an ATP aufweisen, der sich während der Gerinnung verringert. Zu Beginn des Gerinnungsvorganges steht dabei die zuerst reversible, dann irreversible Thrombozytenaggregation, die physiologischerweise durch das ADP ausgelöst wird (GAARDER et al., 1961; HELLEM, 1960). Andere aggregationsauslösende Substanzen, die vermutlich ihre Wirkung auch über eine ADP-Ausschüttung entfalten, sind: Thrombin, Antigen-Antikörper-Komplexe, Latexpartikel, Kollagen und Fibrinogen-Präparationen (KOWALSKI et al., 1964). Auch Serotonin, verursacht eine Thrombozytenaggregation, die jedoch, im Gegensatz zu der durch die oben genennten Substanzen hervorgerufenen, reversibel bleibt.

Schon 1912 zeigten O'CONNOR und ZUCKER, daß

zwischen Thrombozyten und dem Auftreten eines vasokonstriktorischen Effektes eine Beziehung besteht. Die dafür verantwortliche Substanz, "Thrombozytin" genannt, wurde 1949 von RAPPORT aus Rinderserum in kristalliner Form gewonnen, die chemische Struktur aufgeklärt und mit Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) (Abb. 1) benannt. 1952 zeigte ERSPAMER, daß das "Enteramin", gebildet von den enterochronaffinen Zellen der Darmmukosa, mit Serotonin identisch ist. Seit HARDISTY und STACEY (1955) wird angenommen, daß die Thrombozyten ihren hohen Gehalt an Serotonin (Konzentrationsgradient gegenüber Plasma 200:1) nicht selbst synthetisieren, sondern im Darm damit beladen werden.

Die Serotoninaufnahme in die Thrombozyten erfolgt in zwei Schritten (PLETSCHER, 1968; PLETSCHER et al., 1971): dabei stellt die Aufnahme über die Thrombozytenmembran einen spezifischen, aktiven, energieabhängigen Prozeß dar, der z.B. durch KCN oder Imipramin, mit jeweils verschiedenem Wirkungsmechanismus, gehemmt werden kann. Die Diffusion des Serotonins in die Speicherorganellen erfolgt dann passiv, wobei das 5-HT an präformierte Metall-ATP-Komplexe gebunden wird. Der initiale Aufnahmeprozeß folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik (BORN und GILLSON, 1959). Die Thrombozyten können auch andere als

Neurotransmitter bekannte Amine, wie Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin aufnehmen. Von BORN und SMITH (1970) wird für die Adrenalin- und Noradrenalinaufnahme ebenfalls ein aktiver Prozeß angenommen.

Die Serotoninaufnahme kann durch verschiedene Substanzen gehemmt werden, z.B. Chlorpromazin, Cocain und Tryptamin (STACEY, 1961). Andere Hemmstoffe sind Imipramin, das an der äußeren Thrombozytenmembran angreift, und Reserpin, welches mit der 5-HT-Akkumulation in den Speicherorganellen interferiert (TRANZER et al., 1966). Ungeklärt ist die Aufnahmehemmung durch Fenfluramin (BUCZKO et al., 1975), Amphetamin und 1-Aminoadamantan (LEMMER, 1973).

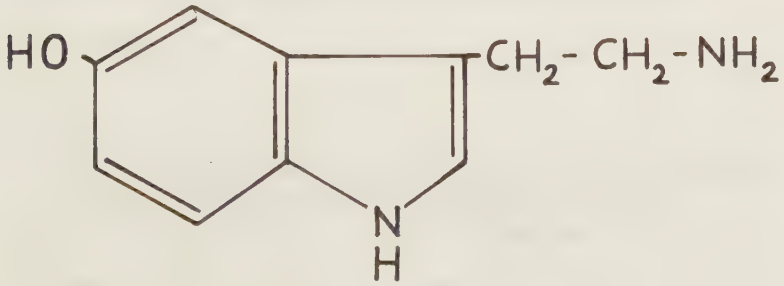
Viele der Substanzen, die Hemmstoffe der Serotoninaufnahme darstellen, vermögen auch eine 5-HT-Freisetzung aus den Thrombozyten zu bewirken. Die Serotoninausschüttung erfolgt dabei relativ langsam, ohne daß eine Aggregation stattfindet: z.B. Reserpin (PAASONEN und PLETSCHER, 1959; PLETSCHER, 1967; DA PRADA et al., 1968), Chlorpromazin (PAASONEN, 1964), Amphetamin und 1-Aminoadamantan (LEMMER, 1973) oder Fenfluramin BUCZKO et al., 1975).

Während der irreversiblen Aggregation, wie sie durch ADP oder Thrombin ausgelöst wird, wird zusätzlich zum Serotonin ATP und ADP aus den Speicherorganellen freigesetzt (HOLMSEN und DAY, 1970). GRETTE (1962) führte den Ausdruck der "release reaction" ein, um die explosionsartige Freisetzung von Serotonin und Adeninnukleotiden durch Thrombin zu charakterisieren. Während die durch Thrombin induzierte Ausschüttung nach 30 Sekunden beendet ist, verwendete MÜRER et al. (1974) den Begriff der Freisetzungsreaktion auch für die durch Natriumfluorid hervorgerufene wesentlich langsamere (10 Minuten) 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung.

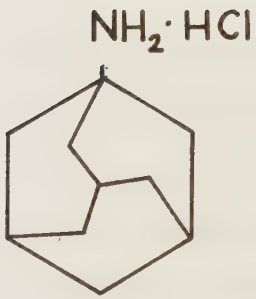
Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß 1-Aminoadamantan (D 1) (Abb. 1), die Muttersubstanz der in dieser Arbeit verwendeten Derivate D 176 und D 178 (Abb. 1), und ihr Dimethylderivat D 145 (1-Amino-3.5-dimethyladamantan) an Synaptosomen aus Rattenhirn in höheren Konzentrationen eine Ausschüttung des in ihnen gespeicherten Serotonins bewirken (WESEMANN und WILDENHAHN, 1975); in niedrigen Konzentrationen hemmen sie die 5-HT-Aufnahme nichtkompetitiv (WESEMANN und SCHOLLMEYER, 1973; WILDENHAHN, 1976). An menschlichen Thrombozyten wurde bereits von LEMMER (1973) die Wirkung des 1-Aminoadamantans bezüglich der Aufnahme und Freisetzung von

Serotonin untersucht; HAACKE und WESEMANN (1977) beschrieben die Wirkung des Dimethylderivates D 145 auf Thrombozyten.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist ein Vergleich der Wirkung des 1-Amino-3-methyladamantans (D 176) und des 1-Amino-3-butyladamantans (D 178) auf menschliche Thrombozyten. Es wurde die Aufnahmekinetik des Serotonins und der Hemmeffekt der beiden Aminoadamantanderivate auf diese Aufnahme, sowie die durch sie bewirkte Serotonin- und Adeninnukleotidfreisetzung in Abhängigkeit von der molaren Wirkstoffkonzentration, der Zeit und der Temperatur untersucht. Die Energieabhängigkeit der Freisetzugsreaktion wurde durch Blockade der Glykolyse und der Atmungskette überprüft. Um eventuelle morphologische Veränderungen zu erfassen, wurden Thrombozyten auch elektronenmikroskopisch untersucht.

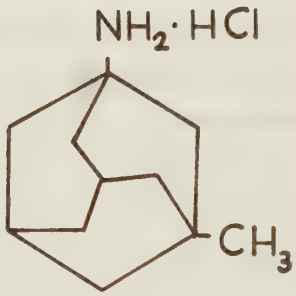


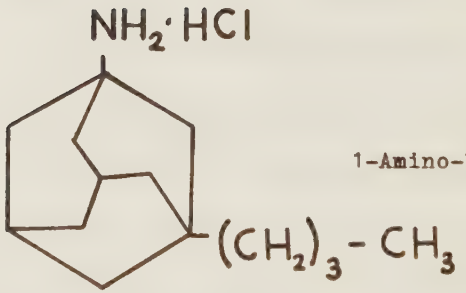

**Serotonin, 5-Hydroxytryptamin (5-HT)**




1-Aminoadamantan (D 1)

1-Amino-3-methyl-
adamantan
(D 176)




1-Amino-3-butyladamantan
(D 178)

Abb. 1: Strukturformeln von 1-Aminoadamantan (D 1), 1-Amino-3-methyladamantan (D 176), 1-Amino-3-butyladamantan und Serotonin (auf der letzten Seite).

## B. METHODEN

### I. Chemikalien

1-Amino-3-methyladamantan·HCl (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan·HCl (D 178) wurden freundlicherweise von MERZ & CO zur Verfügung gestellt. 5-Hydroxy-(3-$^{14}$C)-tryptamin-kreatininsulfat (spez. Aktivität 54 mCi/mMol) stammte von der Firma AMERSHAM-BUCHLER, Braunschweig. Glühwürmchenextrakt, sogenannte "Desiccated Tails of Fireflies", wurde von SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, MISSOURI bezogen, Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Pyruvatkinase von Kaninchenmuskel, Phosphoenolpyruvat, Natriumpyruvat und reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) bei BOEHRINGER MANNHEIM GMBH. Alle übrigen Chemikalien entsprachen p.a.-Qualität.

### II. Gewinnung menschlicher Thrombozyten und Meßmethodik

#### 1. Versuchspersonen

Von freiwilligen gesunden männlichen und weiblichen Blutspendern im Alter von 20 bis 30 Jahren wurden ca. 80 ml Venenblut entnommem. Zur Standardisierung

fand die Blutentnahme zwischen 8 und 9 Uhr morgens statt. Es wurden Blutentnahmekanülen 1,1 x 30 mm der Firma BRAUN, Melsungen benutzt. Um eine Beschädigung der Thrombozyten zu vermeiden, wurde das Blut frei tropfend entnommen und in Plastikröhrchen in jeweils 2 ml 3,8 %iger Natriumcitratlösung, pH 7,4, aufgefangen (ca. 8 ml Blut pro Röhrchen).

2. Gewinnung des Plättchen reichen Plasmas (PRP)

Das Blut-Citratgemisch wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 1700 UpM (460 x g, max.) zentrifugiert. Für diesen und alle weiteren Zentrifugationsvorgänge wurde eine MSE-Tischzentrifuge "Super Minor" benutzt. Der Überstand (aus ca. 80 ml Blut ungefähr 20-25 ml PRP) wurde vorsichtig vom Blutkuchen abpipettiert, gesammelt und mit radioaktiv markiertem ($^{14}$C)5-HT (2,1 x $10^{-6}$ M) 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad mit einer Schüttelfrequenz von 82/Minute vorinkubiert.

3. Herstellung der Thrombozytensuspension und Inkubation

Nach der Inkubation der Thrombozyten mit ($^{14}$C) 5-HT wurde das PRP auf ca. 6 Plastikröhrchen verteilt, etwa 4-5 ml pro Röhrchen, 10 Minuten mit 2300-2400 UpM (860 x g) bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Sofort

nach Auslaufen der Zentrifuge wurden die Überstände dekantiert und verworfen, die Thrombozytenrückstände jeweils in 1 ml Waschlösung nach GAINTNER (1962) durch kurzes Whirlen suspendiert, mit 5 ml Waschlösung versetzt und erneut mit 2300-2400 UpM für 10 Minuten bei Zimmertemperatur abzentrifugiert. Wiederum wurden die Überstände sofort nach Auslaufen der Zentrifuge dekantiert und verworfen und die Rückstände in 1 ml Inkubationslösung nach GAINTNER(1962) durch vorsichtiges Schütteln suspendiert. Die Proben wurden vereinigt und mit Inkubationslösung auf das für die Versuche erforderliche Volumen aufgefüllt (ca. 10-15 ml). Nach Entnahme einer Probe zur Thrombozytenzählung wurde die auf diese Art gewonnene Suspension für die unter Teil III beschriebenen Inkubationen mit einem Aminoadamantanderivat verwendet. Diese Inkubationen wurden anschließend kurz in Eis gestoppt (ca. 2 Minuten), und die Proben bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3000 UpM, 1460 x g). Danach erfolgte die Serotonin- und ATP/ADP-Bestimmung.

4. Thrombozytenzählung

100 µl wurden als Thrombozytenzählprobe der zur Inkubation bestimmten Thrombozytensuspension entnommen, mit 0,9 ml Zähllösung (3,8 % Trinatriumcitrat x 2 $H_2O$, 1 % Formalin) 1:10 verdünnt und gut durchmischt. Eine

NEUBAUER-Zählkammer wurde mit einem Tropfen beschickt und zur Sedimentation der Thrombozyten 30 Minuten in einer feuchten Kammer aufbewahrt; 4 diagonal gelegene Quadrate à 0,04 $mm^2$ wurden ausgezählt. Durch Multiplikation mit 625 x $10^3$ ergibt sich die Thrombozytenzahl pro ml Thrombozytensuspension (ca 1-4 x $10^8$ Thr./ml).

5. Bestimmung der Serotoninfreisetzung bzw. Aufnahme mittels radioaktiv markiertem ($^{14}C$)5-Hydroxytryptamin (5-HT)

Die Inkubation der Thrombozyten mit ($^{14}C$)5-HT erfolgte im PRP; ($^{14}C$)5-HT-Konzentration: 2,1 x $10^{-6}$ M; Vorinkubationszeit: 60 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad. Bei den Freisetzungsversuchen wurde 1 ml der Thrombozytensuspension mit 1 ml gelöstem Aminoadamantanderivat unter verschiedenen Bedingungen (s. Teil III) weiterinkubiert und, wie unter II.3 beschrieben, im Eisbad gestoppt und abzentrifugiert. - Bei den Aufnahmeversuchen fand keine Vorinkubation statt. - Danach wurden die Überstände dekantiert und die Zentrifugenröhrchen ausgewischt, um zurückgebliebene Radioaktivität zu entfernen. Alle folgenden Arbeitsgänge fanden unter Kühlung der Proben statt. Die Rückstände wurden unter Whirlen in 2 ml 0,02 N HCl lysiert, zur Zerstörung der Thrombozyten bei -25°C eingefroren und nach dem Auftauen nochmals gewhirlt. Je zwei 0,5 ml-

Proben sowohl der Überstände als auch der lysierten Thrombozyten wurden zur Messung der Radioaktivität in mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit nach BRAY (1960) gefüllte Zählgefäße überführt; bei der Messung erfolgte die Quenchkorrektur mit Hilfe eines externen Standards. (PACKARD Tri-carb Scintillations-Spektrimeter, Mod. 3380/544)

## 6. ATP/ADP-Bestimmung

### 6.1 Vorbehandlung der Proben

Nach Entnahme der Proben zur radioaktiven ($^{14}C$) 5-HT-Bestimmung wurden jeweils 1 ml-Proben der lysierten Thrombozyten mit 0,5 ml 1,2 M eiskalter Perchlorsäure zur Eiweißfällung versetzt. Alle Proben standen 10 Minuten in Eis und wurden anschließend in der Kälte ($4^{o}C$) zentrifugiert (10 Minuten bei 3000 UpM, 1460 x g). Um die Überstände, die durch Abzentrifugieren der Thrombozyten gewonnen wurden (Absatz II.5), gleich zu behandeln, wurde mit ihnen analog verfahren. Nach der Zentrifugation wurden von den perchlorsauren Thrombozytenlysaten und Überständen jeweils 0,5 ml-Proben entnommen und mit 0,5 ml 0,2 N Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, 1 Tropfen Phenolphtalein als Indikator und 0,2 ml 2 N KOH versetzt. Der Eiweißbodensatz wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes mit verdünnter Säure (ca 0,5 N HCl) oder Lauge (ca 0,5 N

KOH) auf 7,6-7,8 im Eisbad. Die zugefügten Volumina wurden notiert und bei der Auswertung berücksichtigt. Zur Salzsedimentation ($KClO_4$) wurde nochmals zentrifugiert (3000 UpM, 1460 x g). Die dekantierten Überstände wurden entweder sofort weiter umgesetzt oder bei -25°C bis zur späteren Messung, maximal 3 Tage, gelagert.

## 6.2 Ansatz der Eichkurve

Zur Ermittlung des ATP/ADP-Gehaltes der Thrombozyten war es erforderlich, parallel zu jeder Versuchsreihe eine Eichkurve sowohl für ATP, als auch ADP aufzustellen. Dazu wurden 6,6138 mg ATP und 5,6544 mg ADP jeweils in 100 ml Aqua bidest gelöst (Konzentration: 120 nMol/ml). Aus dieser ATP- bzw. ADP-Stammlösung wurden mit $H_2O$ eine Verdünnungsreihe mit 8 Konzentrationen hergestellt (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 etc.). Jeweils 1 ml dieser ATP- bzw. ADP-Verdünnungen wurde mit 2 ml "PCA-Lösung" versetzt, in Eppendorfgefäße abgefüllt und bei -25°C bis zur Messung gelagert (maximal 2 Wochen). Zusammensetzung der "PCA-Lösung": 20 ml 1,2 N PCA und 50 ml 0,5 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, wurden mit ca 20 ml 2 N KOH auf pH 7,6-7,7 eingestellt, 10 Minuten in der Kälte abzentrifugiert (10.000 UpM, 12.050 x g, max. SORVALL, ROTOR SS-34), der Bodensatz mit dem ausgefallenen Salz ($KClO_4$) wurde verworfen. Vergleicht man

die Zusammensetzung der "PCA-Lösung", mit der die Eichkurvenansätze behandelt wurden, mit der Vorbehandlung der zu messenden Proben in Absatz 6.1, so zeigt sich die Analogie des Vorgehens. Die so hergestellten Eichproben (Konzentrationsbereich 8 nMol/0,2 ml bis 0,00625 nMol/0,2 ml) wurden mit Pyruvatkinase umgesetzt (s. Absatz 6.3) und am AMINCO Chem. Glow Photometer gemessen (s. Absatz 6.4). Aus den gewonnenen Meßwerten wurde die Eichkurve für ATP und ADP erstellt (Abb. 2). ADP wurde bei der Umsetzungsreaktion voll-

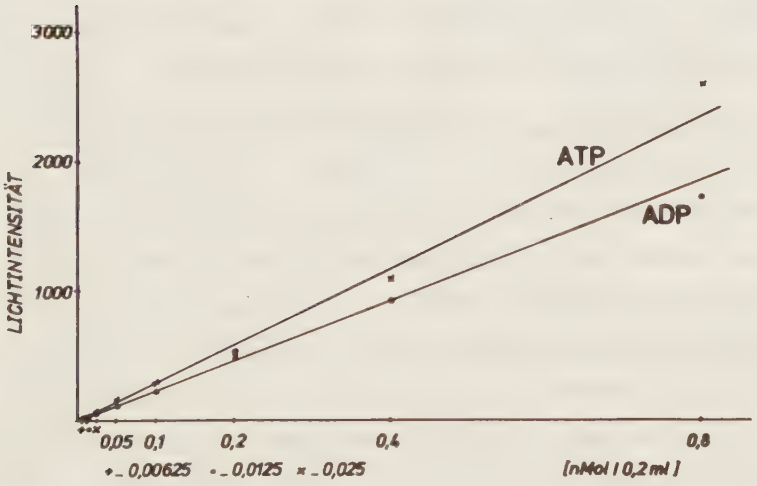



Abb. 2: Eichkurve zur ATP-/ADP-Bestimmung mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Methode

Die Chemolumineszenz wurde mit dem AMINCO Chem. Glow Photometer gemessen. Endkonzentration in den 0,2 ml-Meßproben nach der Umsetzungsreaktion 0,00625 nMol bis 0,8 nMol.

ständig in ATP umgesetzt, dennoch verlief die Eichkurve flacher, da ADP zu ca.25 % mit AMP verunreinigt ist, wie auch von BOEHRINGER angegeben. Der für die Berechnung des ATP- bzw. ADP-Gehaltes der Thrombozyten benötigte "Eichkurvenbezugswert" (s. ANHANG) wurde bei 0,1 nMol aus der ATP-Eichkurve abgelesen.

## 6.3 Umsetzung mit Pyruvatkinase

(modifiziert nach HOLMSEN et al., 1966, 1971)

Da mit dem Luciferin-Luciferase-System am AMINCO Chem. Glow Photometer nur ATP bestimmt werden kann, mußte in den für die ADP-Bestimmung vorgesehenen Proben zuvor das ADP in ATP umgewandelt werden:

$$\underset{\text{(PEP)}}{\text{Phosphoenolpyruvat}} + \text{ADP} \xrightarrow[\text{(PK)}]{\text{Pyruvatkinase}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$

Die Umsetzung wurde mit aktiver gepufferter PEP-PK-Lösung durchgeführt. Diese setzte sich zusammen aus:

10 µl Pyruvatkinase, Aktivität 200 E/mg

2 ml 0,2 M Trismaleatpuffer, pH 7,6

100 µl 10 mM PEP-Lösung: 4,653 mg PEP in 1 ml Lösung aus $MgSO_4$ 0,4 M (4,8592 g/100 ml) und KCL 1,3 M (9,6928 g/100 ml)

Mit aqua bidest wurde auf 25 ml aufgefüllt.

Die PEP-PK-Lösung wurde kurz vor Gebrauch hergestellt und mußte innerhalb von 5 Minuten zu den Proben für die ADP-Bestimmung pipettiert werden. Je 0,2 ml der

Proben wurden mit 2 ml aktiver PEP-PK-Lösung versetzt, 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Enzymreaktion belassen, 6 Minuten auf 80°C erhitzt und danach im Eis abgekühlt. Die Proben, in denen das ATP direkt gemessen werden konnte, wurden ebenfalls mit PEP-PK-Lösung versetzt, welche allerdings zuvor durch 20-minütiges Erhitzen auf 80°C mit anschließendem Abkühlen inaktiviert worden war.

## 6.4 Extraktion des Luciferin-Luciferase-Systems

Die ATP/ADP-Bestimmung wurde mit einer Modifikation der von HOLMSEN et al. (1966, 1971) beschriebenen Firefly-Luciferase-Methode durchgeführt. Zur Extraktion wurden 75 mg "Desiccated Tails of Fireflies" mit etwas Seesand und einigen Tropfen gekühltem Arsenatpuffer (s.u.) in einem ebenfalls vorgekühlten Mörser zerrieben und mit 10 ml Arsenatpuffer aufgefüllt. Der Extrakt wurde 10 Minuten mit 3000 UpM (1086 x g, max.; SORVALL, Rotor SS-34) bei 4°C abzentrifugiert, und der Überstand mit $MgSO_4$ x 7 $H_2O$ (49,3 mg /10 ml, 0,02 M) versetzt. Die erste Messung sollte erst nach 3-4 Stunden erfolgen, bis dahin muß das Luciferin-Luciferase-System bei 0-4°C im Dunkeln stehen. Der Firefly-Extrakt konnte für 2-3 Wochen bei -25°C aufbewahrt werden. Arsenat-Puffer: 0,1 M, pH 7,4; hergestellt aus $NaHAsO_4$ x 7 $H_2O$, pH-Einstellung erfolgte mit verdünnter (ca.0,5 N) $H_2SO_4$.

## 6.5 ATP/ADP-Messung

Zur Stabilisierung wurde das AMINCO Chem. Glow Photometer 30 Minuten vor Beginn der Messung eingeschaltet. Die Messungen wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Mittels des Luciferin-Luciferase-Systems wurde die Lichtintensität folgender Reaktion gemessen:

$$\text{Luciferin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Luciferase}} \text{Licht} + \text{ADP}$$

Dazu wurden 5 cm lange Glasküvetten, Durchmesser von 5 mm, mit 0,1 ml des Firefly-Extraktes gefüllt und der Nullwert abgelesen. Mit einer 0,5 ml-Spritze wurden dann 0,2 ml von den zu messenden Proben möglichst gleichmäßig und schnell in die Küvetten gespritzt. Die Lichtausstrahlung erfolgt zwar über mehrere Minuten, erreicht aber 2 Sekunden nach der Injektion ihr Maximum, welches nach HOLMSEN (1966) bis zu einer Konzentration von 2 µM dem ATP-Gehalt proportional ist. Während der gesamten Messung wurden sowohl Proben, als auch Firefly-Extrakt im Eisbad aufbewahrt.

## 7. Ansatz der Pufferlösungen

Nach GAINTNER et al. (1962) wurden angesetzt: Thrombozytenwaschlösung: 0,103 M NaCl; 0,04 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 0,0047 M $KH_2PO_4$; 0,0005 M Glukose; 0,0129 M $Na_3$Citrat. Der pH wurde mit 0,04 M NaOH auf

einen Wert von 6,4 eingestellt. Die Thrombozyten-Inkubationslösung wurde ebenso angesetzt, lediglich der pH auf 7,4 eingestellt.

## III. Spezielle Versuchsanordnungen

### 1. Induktion der Freisetzungsreaktion

Mit den Substanzen 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) wurde eine "release reaction" induziert. Die Thrombozyten, wurden zuvor, wie unter II.2 und II.3 beschrieben, im PRP mit ($^{14}$C)5-HT in einer molaren Konzentration von 2,1 x $10^{-6}$M inkubiert, abzentrifigiert, gewaschen und in GAINTNER-Lösung resuspendiert, außerdem wurde eine Thrombozytenzählprobe entnommen. Inkubiert wurden 1 ml der Thrombozytensuspension mit 1 ml D 176 bzw. D 178, gelöst im Inkubationsmedium nach GAINTNER (1962). Nach den unter Absatz II beschriebenen Verfahren wurden Serotonin, ATP und ADP sowohl in den Überständen als auch in den Thrombozytenrückständen bestimmt. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

#### 1.1 Abhängigkeit der Freisetzungsreaktion von der molaren Konzentration der Aminoadamantanderivate

1-Amino-3-methyladamantan (D 176) wurde im Konzentrationsbereich von 5 x $10^{-5}$ M bis 5 x $10^{-2}$ M,

1-Amino-3-butyladamantan (D 178) im Bereich von $10^{-5}$ M bis 5 x $10^{-3}$ M untersucht. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C. Kontrollen ohne Aminoadamantanderivat wurden mitinkubiert, um den nicht durch D 176 bzw. D 178 bedingten Anteil der Freisetzung von 5-HT, ATP und ADP zu erfassen.

1.2 Zeitabhängigkeit der Freisetzungsreaktion

Menschliche Thrombozyten wurden 5, 10, 20 und 30 Minuten bei 37°C inkubiert: mit 1-Amino-3-methyladamantan (D 176), 5 x $10^{-3}$ M und $10^{-2}$ M, bzw. 1-Amino-3-butyladamantan (D 178), $10^{-4}$ M und $10^{-3}$ M.

1.3 Temperaturabhängigkeit der Freisetzungsreaktion

Bei 0°C, Zimmertemperatur (20-22°C), 30°C, 33°C und 37°C wurden für 30 Minuten menschliche Thrombozyten mit 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) 5 x $10^{-3}$ M und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) 5 x $10^{-4}$ M inkubiert.

2. Zeitabhängigkeit der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme

Im Gegensatz zu den Freisetzungsversuchen wurde bei diesen Versuchen das PRP nicht mit radioaktiv markiertem Serotonin vorinkubiert (s. I.5). Je 1 ml Thrombozytensuspension wurden 200 µl ($^{14}$C)5-HT (End-

konzentration 2,3 x $10^{-6}$ M) zugesetzt, und mit Inkubationslösung auf ein Endvolumen von 2 ml aufgefüllt. Es wurde bei 37°C inkubiert. Der Aufnahmevorgang wurde nach 5, 10, 20 und 30 Minuten durch 2-minütiges Kühlen in Eis unterbrochen. Der Anteil der passiven Diffusion wurde durch entsprechende Eiskontrollen ermittelt. Um die Molarität an Serotonin im Inkubationsmedium bis zum Versuchsende relativ konstant zu halten, wurde eine gleichbleibend niedrige Thrombozytenzahl durch Adjustierung mit GAINTNER-Lösung auf ca. 0,1 x $10^9$ Thrombozyten pro ml Suspension angestrebt.

3. Konzentrationsabhängigkeit der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme

Eine Vorinkubation des PRP mit ($^{14}$C)5-HT wurde bei diesen Versuchen nicht vorgenommen. Nach 5 Minuten bei 37°C (linearer Bereich der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahmekurve, s. Abb. 8) wurde die Serotoninaufnahme der Thrombozyten im Eisbad unterbrochen (Kühlung 2 Minuten). Gewählter 5-HT-Konzentrationsbereich: zwischen $10^{-7}$ M und 2,3 x $10^{-6}$ M. Zur Ermittlung des Anteils passiver Diffusion dienten Kontrollen im Eisbad.

4. Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme

Der Hemmeffekt von D 176 bzw. D 178 auf die ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme von menschlichen Thrombozyten

wurde bei 37°C und einer Versuchsdauer von 5 Minuten ermittelt. Verwendeter ($^{14}$C)5-HT-Konzentrationsbereich von $10^{-7}$ M bis 2,3 x $10^{-6}$ M bei gleichzeitiger Anwesenheit folgender Hemmstoffkonzentrationen: 1-Amino-3-methyladamantan (D 176): $10^{-5}$ M - $10^{-3}$ M bzw. 1-Amino-3-butyladamantan (D 178): $10^{-6}$ M - $10^{-4}$ M. Proben ohne Hemmstoff, bei 37°C und 4°C inkubiert, dienten als Kontrollen. Außerdem wurde für jede Hemmstoffkonzentration eine Kontrollprobe bei 4°C mitangesetzt.

5. Untersuchungen zur Hemmung der Glykolyse und der Atmungskette

Die Thrombozyten wurden bei 37°C im PRP 60 Minuten mit ($^{14}$C)5-HT vorinkubiert. Die Hemmstoffe Monojodacetat und Natriumcyanid wurden in drei Kombinationen ($H_1$, $H_2$, $H_3$) verwendet. Monojodacetat blockiert die Glykolyse, Natriumcyanid den Elektronentransport in der Atmungskette.

$H_1$ : NaCN $10^{-2}$ M, Monojodacetat 5 x $10^{-3}$ M

$H_2$ : NaCN 5 x $10^{-3}$ M, Monojodacetat 5 x $10^{-3}$ M

$H_3$ : NaCN $10^{-3}$ M, Monojodacetat 5 x $10^{-3}$ M

Die Thrombozytensuspension wurde 30 Minuten bei 37°C mit den Hemmstoffkonzentrationen vorbehandelt, danach mit 1-Amino-3-methyladamantan (D 176), 5 x $10^{-3}$ M, bzw. mit 1-Amino-3-butyladamantan (D 178), 5 x $10^{-4}$ M,

weitere 30 Minuten inkubiert. Als Berechnungsgrundlage dienten Kontrollen, die 60 Minuten nur mit Hemmstoff behandelt worden waren. Unter denselben Bedingungen wurden Freisetzungsreaktionen mit D 176 und D 178 ohne Zusatz von Hemmstoff zum Vergleich durchgeführt.

6. LDH-Bestimmung

Es wurde mit D 176 und D 178 eine wie unter Absatz III.1 beschriebene Freisetzungsreaktion an menschlichen Thrombozyten durchgeführt; Konzentration an 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) $5 \times 10^{-3}$ M, an 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) $5 \times 10^{-4}$ M. Danach wurde die Lactatdehydrogenase nach BERGMEYER (1970) in den Überständen gemessen, die durch Zentrifugation der Thrombozytensuspension gewonnen wurden. Die LDH-Bestimmung eines zuvor bei $-25^{o}$C gefrorenen (30 Minuten) und danach aufgetauten Thrombozytenlysates diente als Vergleich.

7. Elektronenmikroskopie

Herrn Dr. Norbert Paul, vom Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, sei gedankt für die Untersuchung der Thrombozyten und die umfangreiche Dokumentation in Bildserien. Benutzt wurde ein ELMISCOP I, SIEMENS. Als Untersuchungsmaterial dienten unbehandelte Thrombozyten vom Menschen und vom Ka-

ninchen und solche, an denen zuvor mit 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) eine Freisetzungsreaktion unter den in Absatz III.1 genannten Bedingungen durchgeführt worden war. Es wurde eine Konzentration von $10^{-3}$ M verwendet. Anschließend wurden die Thrombozyten mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert. Die Kontrastierung erfolgte mit Uranylacetat.

## ANHANG

Berechnung:

ad III.1 Freisetzungsversuche

a) 5-HT-Freisetzung:

($^{14}$C)5-HT wurde in jeder Versuchsprobe, wie unter II.5 beschrieben, im Überstand ($Ü_{Probe}$) und Thrombozytenrückstand ($TR_{Probe}$) gemessen. Auch bei den Kontrollen wurde der Serotoningehalt des Überstandes ($Ü_{Kontrolle}$) bzw. des Thrombozytenrückstandes ($TR_{Kontrolle}$) getrennt bestimmt. Die ZpM-Werte jedes Probenüberstandes wurde um den Mittelwert der Kontrollüberstände korrigiert ($Ü_{Probe} - Ü_{Kontrolle} = Ü_{korrigiert}$), um den nicht freisetzungsbedingten Anteil an Serotonin zu berücksichtigen. Der Anteil des nun korrigierten Überstandswertes an der Summe aus Thrombozytenrückstandswert + korrigiertem Überstandswert entspricht der Freisetzung in %. Da der Verdünnungsfaktor bei Überstand und Thrombozytenrückstand derselbe ist, spielt er in der prozentualen Auswertung keine Rolle.

$$(^{14}C)5\text{-HT-Freisetzung in \%} = \frac{Ü_{korrigiert}}{Ü_{korrigert} + TR_{Probe}} \times 100$$

b) ($^{14}$C)5-HT-Gesamtgehalt:

Der Gesamtgehalt an ($^{14}$C)-Serotonin in nMol/$10^9$

Thrombozyten berechnet sich aus der Summe von nicht korrigiertem Überstand und dazugehörigem Thrombozytenrückstand einer Probe ($TR_{Probe} + Ü_{Pobe}$). Der Überstandswert wurde nicht korrigiert, um den durch die Suspension in GAINTNER-Lösung verlorengehenden ($^{14}C$)5-HT-Anteil mit zu erfassen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\frac{\text{nMol 5-HT}}{10^9 \text{ Thrombozyten}} = \text{ZpM} \times \frac{\frac{\text{Mol } (^{14}C)5\text{-HT}}{\text{ZpM}} \times \text{Verd.faktor}^*}{\text{Thrombozytenzyhl} \times 10^9 \text{ / ml}}$$

* Verdünnungsfaktor

c) ATP/ADP-Freisetzung:

Die Berechnung der ATP-Freisetzung in % erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren. Die Überstandswerte wurden auch hier um die der Kontrollen korrigiert (wie bei der 5-HT-Freisetzungsberechnung). Da wegen der Meßbedingungen ADP in ATP umgesetzt wurde, mußten die eigentlichen ADP-Werte aus der Differenz (ATP + umgewandeltes ADP) - ATP zunächst ermittelt werden, bevor die prozentuale Berechnung erfolgen konnte.

d) ATP/ADP-Gesamtgehalt:

Zur Ermittlung des Gehaltes an ATP (bzw. ADP) in nMol/$10^9$ Thrombozyten wurden nur die Summen aus Überstands- und Thrombozytenrückstandswerten der Kontrol-

len verwendet, da sich der Gesamtgehalt bei der Freisetzungsreaktion erniedrigt (s. C, Absatz 4).

$$\frac{\text{nMol ATP}}{10^9 \text{ Thromb.}} = \frac{\text{Meßwert} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\frac{\text{"Eichkurvenbezugswert"}}{\text{1 nMol ATP}} \times \frac{\text{Thromb.zahl} \times 10^9}{\text{ml}}}$$

Thromb. ... Thrombozyten

ad III.4 Hemmung der Glykolyse und der Atmungskette

Da durch die 30-minütige Vorinkubation mit Hemmstoffen der Glykolyse ein beträchtlicher Ausstrom an 5-HT, ATP und ADP bestand (bis zu 70 % des Gesamtgehaltes), wurde die Berechnung der Freisetzung als Erniedrigung in % vom Thrombozytenrückstand der 60-Minuten-Kontrolle durchgeführt, d.h.: das, was an 5-HT, ATP bzw. ADP nach zusätzlicher Auslösung einer Freisetzungsreaktion noch im Thrombozytenrückstand einer Probe ($TR_{Probe}$) enthalten war, wurde dazu in Beziehung gesetzt:

$$\text{Freisetzung in \%} = \frac{TR_{60\text{-Min.-Kontrolle}} - TR_{Probe}}{TR_{60\text{-Min.-Kontrolle}}}$$

Min. ... Minuten

Die Berechnung der zum Vergleich durchgeführten Freisetzungen ohne Zusatz von Natriumcyanid und Monojodacetat erfolgte analog; hierbei wurde der ($^{14}C$)5-HT-, ATP- bzw. ADP-Gehalt von Thrombozyten gleich 100 %

gesetzt, die 60 Minuten nur in GAINTNER-Lösung inkubiert worden waren.

## C. ERGEBNISSE

### 1. Konzentrationsabhängigkeit der Adamantan-induzierten Freisetzung aus menschlichen Thrombozyten

#### 1.1 Freisetzung durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176)

Nach Vorinkubation mit radioaktiv markiertem 5-HT (s. unter B, II 5.) wurden menschliche Thrombo-

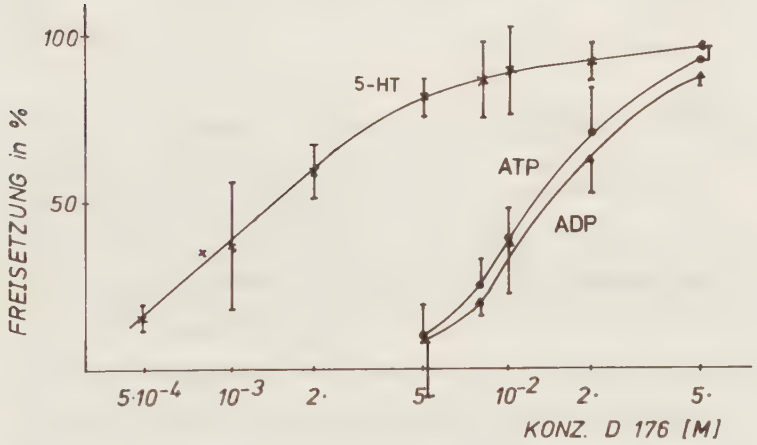



Abb. 3: Freisetzung von ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176)

Nach 60-minütiger Vorinkubation von PRP mit 2,1 x $10^{-6}$ M ($^{14}$C)5-HT (spez. Akt. 54 mCi/mMol), Zentrifugation, Waschen und Resuspendieren in GAINTNER-Lösung wurden menschliche Thrombozyten 30 Minuten bei 37°C mit D 176 inkubiert. Der ($^{14}$C)5-HT-, ATP- und ADP-Gesamtgehalt der Thrombozyten wurde nach Korrektur um den Anteil der Spontanfreisetzung = 100 % gesetzt. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus 3-8 Versuchen und die Standardfehler des arithmetischen Mittels ($s_{\bar{x}}$).

zyten 30 Minuten bei 37°C mit D 176 in einem Konzentrationsbereich von 5 x $10^{-5}$ M bis 5 x $10^{-2}$ M inkubiert. Dabei zeigte sich, daß die Freisetzung von ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP konzentrationsabhängig war; die Serotoninausschüttung begann bereits bei 5 x $10^{-4}$ M, die Ausschüttung der Adeninnukleotide erst bei 5 x $10^{-3}$ M, eine Zehnerpotenz höher. Bei $10^{-2}$ M begann sich bei der Serotoninfreisetzung ein Plateau abzuzeichnen; die ATP/ADP-Ausschüttung glich sich den Werten der ($^{14}$C)5-HT-Freisetzung erst bei 5 x $10^{-2}$ M an (Abb. 3).

1.2 Freisetzung durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178)

Die Freisetzung des zuvor inkorporierten ($^{14}$C) 5-HT (s. B, II 5.) und der Adeninnukleotide ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch D 178 ($10^{-5}$ M - $10^{-3}$ M, 30 Minuten bei 37°C) zeigte ebenso, wie durch das Methylderivat D 176, eine Abhängigkeit von der molaren Wirkstoffkonzentration. Das Butylderivat des 1-Aminoadamantans erwies sich als stärkerer Induktor: ($^{14}$C)5-HT wurde bereits bei 5 x $10^{-5}$ M zu 8 % freigesetzt, ein Plateau der Serotoninausschüttung bei 6 x $10^{-3}$ M erreicht. Auch die Freisetzung von ATP und ADP begann bei niedrigeren molaren Konzentrationen (5 x $10^{-4}$ M), verglichen mit D 176 (Beginn bei 5 x $10^{-2}$ M). Jedoch erforderte auch hier

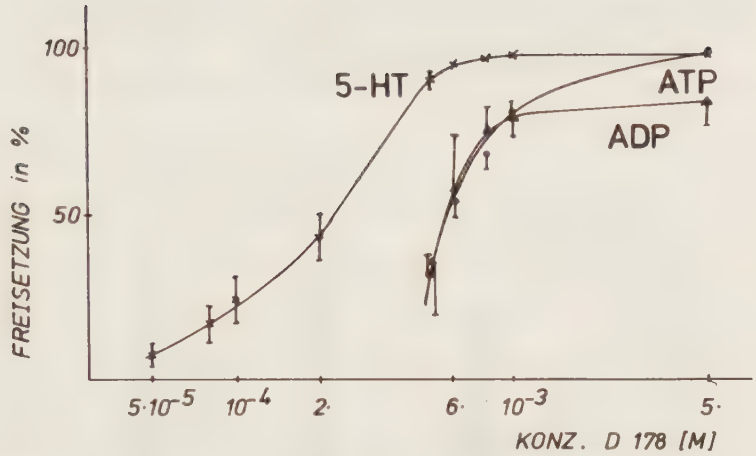



Abb. 4: Freisetzung von ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178)

Versuchsbedingungen und Berechnung siehe in der Legende zu Abb. 3. Aufgetragen wurden die Mittelwerte und die Standardfehler ($s_{\bar{x}}$) aus 5 Versuchen.

der Beginn der Adeninnukleotidfreisetzung eine höhere Konzentration an Wirkstoff als bei der Serotoninausschüttung. Es bestand ein Abstand von ebenfalls einer Zehnerpotenz (Abb. 4).

## 2. Induktion der Freisetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Zeit

### 2.1 Zeitabhängigkeit der Freisetzungsreaktion durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176)

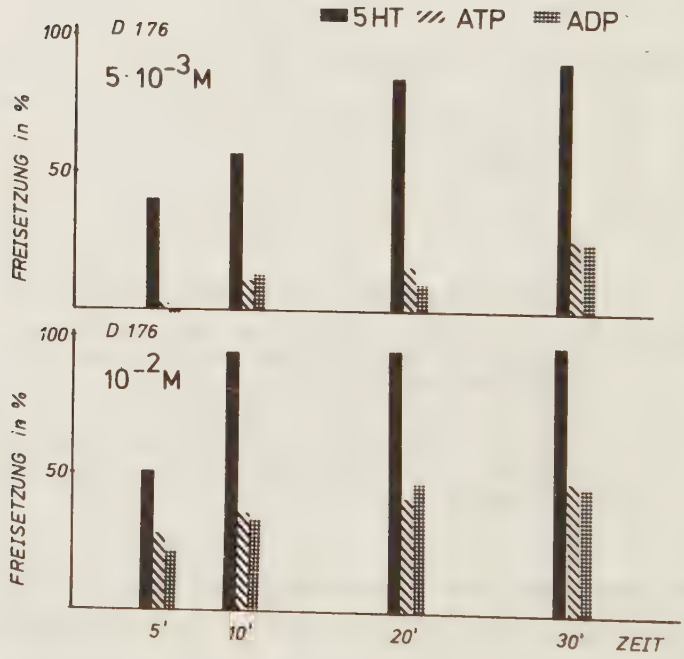



Abb. 5: Zeitabhängigkeit der Freisetzung von ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Amino-3-methyladamartan (D 176)

Nach Vorbehandlung der Thrombozyten, wie in der Legende zu Abb. 3 beschrieben, erfolgte die Inkubation in GAINTNER-Lösung bei 37°C. Auftragung der Freisetzung in % des ($^{14}$C)5-HT-, ATP- und ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Abzug der Spontabfreisetzung. Mittelwerte aus 2 Versuchen.

Menschliche Thrombozyten wurden mit den beiden D 176-Konzentrationen 5 x $10^{-3}$ M und $10^{-2}$ M bei 37°C in GAINTNER-Lösung inkubiert; nach 5, 10, 20 und 30 Minuten wurde die Reaktion durch 2-minütiges Kühlen im Eisbad gestoppt. Bei der niedrigeren Konzentration zeigte sich ein langsamerer zeitabhängiger Verlauf der Serotonin-, ATP- und ADP-Freisetzung (Abb. 5). Zwischen 5, 10 und 20 Minuten erfolgte eine deutliche Zunahme der Freisetzung, nach 20 Minuten war die ($^{14}$C)5-HT-Freisetzung praktisch beendet, die ATP- una ADP-Ausschüttung nahm noch weiter zu. Bei der höheren Konzentration ($10^{-2}$ M) ist die ($^{14}$C)5-HT-Freisetzung nach 10 Minuten, die Adeninnukleotidfreisetzung schon nach 20 Minuten fast vollständig beendet. Die 30-Minuten-Werte für die Serotonin- und Adeninnukleotidausschüttung lagen in diesen beiden Versuchen höher als die für diese Wirkstoffkonzentration in Abb. 3 aufgetragenen Mittelwerte.

## 2.2 Zeitabhängigkeit der Freisetzungsreaktion durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178)

Bei 37°C wurden menschliche Thrombozyten in GAINTNER-Lösung mit 2 Wirkstoffkonzentrationen D 178 ($10^{-4}$ M und $10^{-3}$ M) für 5, 10, 20 und 30 Minuten inkubiert. Die zeitabhängige Reaktion verlief bei der niedrigeren Konzentration langsamer als bei der

höheren, ähnlich wie beim Zeitverlauf der Freisetzung mit D 176 (s. 2.1). Bei Inkubation mit D 178, $10^{-4}$ M, erreichte die Serotoninausschüttung zwischen 20 und 30 Minuten ein Plateau und war somit beendet; der 10-Minuten-Wert betrug ca. 50 % des Endwertes

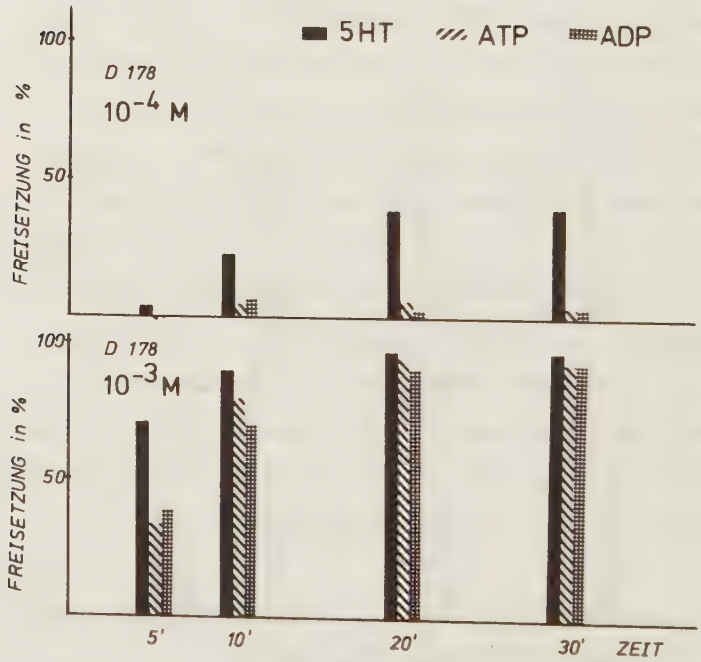



Abb. 6: Zeitabhängigkeit der Freisetzung von ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178)

Nach Vorbehandlung der Thrombozyten, wie in der Legende zu Abb. 3 beschrieben, erfolgte die Inkubation in GAINTNER-Lösung bei 37°C. Auftragung der Freisetzung in % des ($^{14}$C)5-HT-, ATP- und ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Abzug der Spontanfreisetzung. Mittelwerte aus 2 Versuchen.

(Abb. 6). In Übereinstimmung mit Abb. 4 zeigte sich keine wesentliche ATP- oder ADP-Freisetzung. Bei der höheren Konzentration wies die Serotoninausschüttung einen starken Anstieg in den ersten 5 Minuten mit nachfolgender Verlangsamung und einem Plateaubeginn zwischen 10 und 20 Minuten auf, während die ATP/ADP-Ausschüttung in den ersten 10 Minuten gleichmäßig steil anstieg, dann erst abflachte und das Freisetzungsmaximum nach 20 Minuten erreichte.

3. Induktion der Freisetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Temperatur

Die Inkubation menschlicher Thrombozyten bei 0°C, Zimmertemperatur (20°C - 22°C), 30°C, 33°C und 37°C für 30 Minuten zeigte eine klare Temperaturabhängigkeit der Serotonin-, bzw. ATP/ADP-Freisetzung durch D 176 und D 178. 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) wurde in einer Konzentration von $5 \times 10^{-3}$ M, 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) von $5 \times 10^{-4}$ M verwendet. Während 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) bei 0°C und Zimmertemperatur nur geringfügig über den Kontrollen liegende Ausschüttungswerte für ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP zeigte, rief 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) schon bei 0°C eine ($^{14}$C)5-HT-Freisetzung von ca. 20 % hervor; bei Zimmertemperatur zeigte sich eine Serotoninfreisetzung von ca. 30 %, zusammen mit

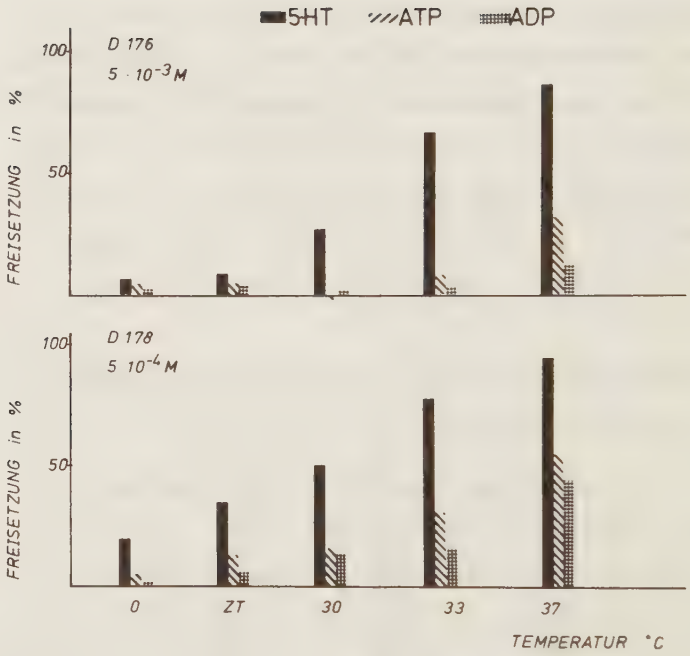



Abb. 7: Temperaturabhängigkeit der Freisetzung von ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178)

Nach Vorbehandlung der Thrombozyten, wie in der Legende zu Abb. 3 beschrieben, erfolgte die Inkubation in GAINTNER-Lösung für 30 Minuten. Auftragung der Freisetzung in % des ($^{14}$C)5-HT-, ATP- und ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Abzug der Spontanfreisetzung. Mittelwerte aus 4 Versuchen.

einer beginnenden Adeninnukleotidausschüttung (Abb.7).

Die Freisetzung von Serotonin, ATP und ADP durch

D 178 nahm dann mit jeder Temperaturstufe zu und erreichte bei 37°C ihren höchsten Wert. Mit D 176 begann die ($^{14}$C)5-HT-Freisetzung bei 30°C, die von ATP/ADP erst bei 33°C; beide erreichten ihren höchsten Wert bei 37°C. Die 37°C-Werte der Freisetzung durch D 176, bzw. D 178 lagen für Serotonin in gleicher Höhe mit den in Abb. 3 bzw. 4 aufgetragenen, die Werte für ATP und ADP lagen insgesamt höher.

4. Gesamtgehalt menschlicher Thrombozyten an ($^{14}$C)5-HT, ATP und ADP

Tabelle 1 gibt Auskunft über die Akkumulation von exogenem, radioaktiv markiertem Serotonin, sowie die ATP- und ADP-Konzentrationen in menschlichen Thrombozyten in nMol/$10^9$ Thrombozyten und deren Quotienten. Der Gesamtgehalt errechnete sich jeweils aus den Werten für Thrombozyten und Überstand (genaue Berechnung siehe B, ANHANG). Zu dieser Berechnung wurden die Ergebnisse aus den Versuchen 1.2 und 1.2 herangezogen. Es ergab sich ein durchschnittlicher Gehalt an markiertem Serotonin von 9,3 nMol/$10^9$ Thrombozyten, der ATP-Gehalt betrug 64,2 nMol/$10^9$ Thrombozyten, der ADP-Gehalt 39,0 nMol/$10^9$ Thrombozyten, mithin der durchschnittliche Gesamtgehalt an Adeninnukleotiden 101,0 nMol/$10^9$ Thrombozyten. Daraus ergibt sich eine Relation von

Tabelle 1: Gesamtkonzentration an ($^{14}$C)5-HT*, ATP und ADP in menschlichen Thrombozyten

| | nMol/$10^9$ Thrombozyten |
|---|---|
| ($^{14}$C)5-HT* | 9,3 ± 0,7 (12) |
| ATP | 64,2 ± 4,7 (13) |
| ADP | 39,0 ± 4,7 (12) |
| ATP + ADP | 101,0 ± 8,6 (12) |
| $\frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$ | 1,7 ± 0,1 (12) |
| $\frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$ nach Freisetzung durch D 176 und D 178 | 1,2 ± 0,1 (11) |
| $\frac{\text{ATP + ADP}}{(^{14}\text{C})5\text{-HT}^*}$ | 10,8 |
| $\frac{\text{ATP}}{(^{14}\text{C})5\text{-HT}^*}$ | 6,9 |
| $\frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$ im Überstand nach der Freisetzung durch D 176 und D 178 | 1,0 ± 0,09 |

Aufgeführt sind die Mittelwerte ± $s_{\bar{x}}$ aus (n) Versuchen
* 60-minütige Inkubation des PRP bei 37°C mit ($^{14}$C)5-HT 2,1 x $10^{-6}$ M

1,7 für ATP : ADP. Diese Daten gelten für Thrombozyten, an denen keine Freisetzungsreaktion induziert wurde. Wurde ($^{14}$C)5-HT mit 1-Amino-3-methyladamantan (D 176 oder 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) freigesetzt, so änderte sich der Gesamtgehalt der Thrombozyten an Serotonin nicht. Wurde jedoch auch ATP und ADP ausgeschüttet, so war eine Abnahme des Gesamt-

ATP-Gehaltes um durchschnittlich 28 % zu verzeichnen; der Gesamt-ADP-Gehalt blieb nahezu unverändert. Damit reduzierte sich der Quotient Gesamt-ATP zu Gesamt-ADP, ermittelt aus beiden Versuchsreihen, der vor der Freisetzungsreaktion 1,7 ± 0,1 betragen hatte, auf 1,2 ± 0,1 ($s_{\bar{x}}$). Das Verhältnis ATP : ADP war in den Überständen nach der Freisetzung durch D 176 und D 178 1,0 ± 0,09 ($s_{\bar{x}}$). Für die Berechnung wurden nur Werte von Proben verwendet, bei denen eine mindestens 30 %ige Adeninnukleotidausschüttung zu verzeichnen war.

5. Zeitabhängigkeit der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme menschlicher Thrombozyten

Die Inkubation menschlicher Thrombozyten mit ($^{14}$C)5-HT 2,3 x $10^{-6}$ M bei 37°C zeigte eine schnelle lineare 5-HT-Zunahme in den ersten 5 Minuten, verlangsamte sich mit Ablauf der Zeit kontinuierlich und erreichte nach 30 Minuten den Beginn eines Sättigungsplateaus (Abb. 8). Zur Erfassung der unspezifischen Aufnahme wurde gleichzeitig in Eis unter sonst identischen Bedingungen inkubiert, dieser Anteil blieb unabhängig von der Inkubationszeit konstant.

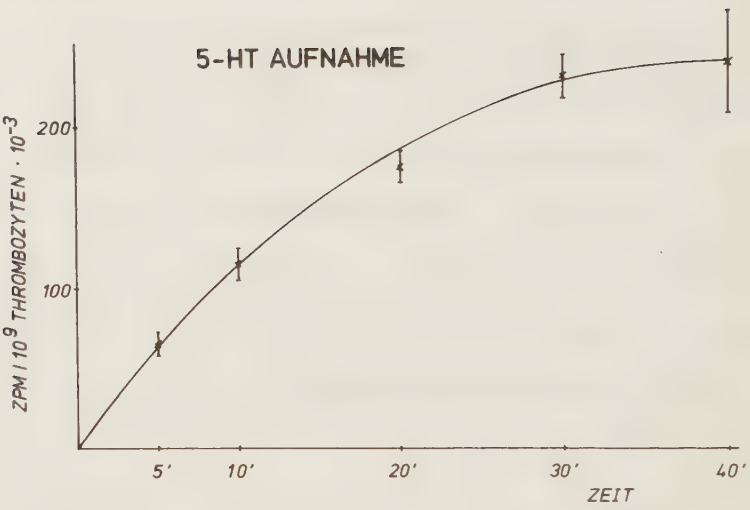



Abb. 8: Abhängigkeit der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme menschlicher Thrombozyten von der Zeit

1,8 ml Thrombozytensuspension wurde mit 200 µl ($^{14}$C)5-HT (Endkonzentration 2,3 x $10^{-6}$ M) bei 37°C inkubiert. Die Werte wurden um den konstant bleibenden unspezifischen Anteil der Serotoninaufnahme korrigiert. Mittelwerte und die Standardfehler ($s_{\bar{x}}$) errechnen sich aus 7 Versuchen mit jeweils Doppelbestimmungen, bei 40 Minuten nur 2 Versuche.

## 6. Kinetik der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme

Suspensionen menschlicher Thrombozyten in GAINTNER-Lösung wurden bei 37°C mit ($^{14}$C)5-HT-Konzentrationen von $10^{-7}$ M bis 2,3 x $10^{-6}$ M für 5 Minuten inkubiert. Diese Konzentrationen wurde gewählt, da nach den Ergebnissen von C 5. die Serotoninaufnahme

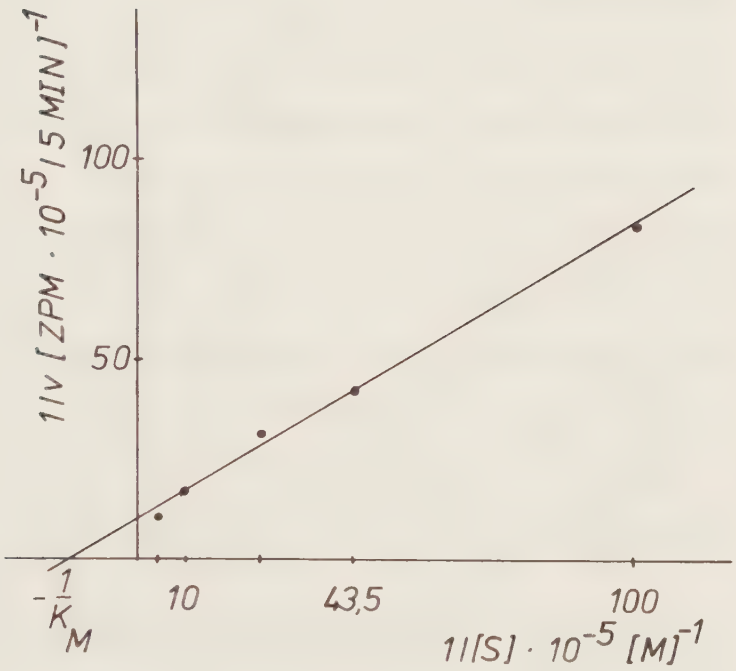



Abb. 9: Abhängigkeit der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme in menschliche Thrombozyten von der Serotoninkonzentration

Auftragung nach LINEWEAVER-BURK. Eine Suspension menschlicher Thrombozyten in GAINTNER-Lösung wurde 5 Minuten bei 37°C mit Serotoninkonzentrationen von $10^{-7}$ M bis 2,3 x $10^{-6}$ M inkubiert. Es wurde um den unspezifischen Anteil der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert die Werte für die spezifische Aufnahme eines Einzelversuches. Als Mittelwert aus 6 solchen Versuchen ergab sich

$K_M = (7,5 \pm 3,0) \times 10^{-7}$ M $(s_{\bar{x}})$

in den ersten 5 Minuten linear anstieg, und die 5-HT-

Aufnahmegeschwindigkeit somit konstant blieb. Es waren sowohl der unspezifische Anteil, der durch Inkubation bei 4°C ermittelt wurde, als auch der spezifische Anteil der ($^{14}$C)5-HT-Gesamtaufnahme den steigenden Serotoninkonzentrationen im Inkubationsmedium proportional. Durch Substraktion des unspezifischen Anteils von der Totalaufnahme wurde der spezifische Anteil ermittelt und nach LINEWEAVER-BURK (1934) aufgetragen. Zuvor wurde die Regression der Geraden berechnet. Der Schnittpunkt mit der x-Achse ergab die MICHAELIS-Konstante (Abb. 9). Der mittlere $K_M$-Wert aus 6 Versuchen betrug (7,5 ± 3,0) x $10^{-6}$ M ($s_{\bar{x}}$). Der entsprechende $V_{max}$-Wert lag bei 0,22 ± 0,04 ($s_{\bar{x}}$) nMol 5-HT/$10^9$ Thrombozyten/Minute.

## 7. Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme in menschliche Thrombozyten

Bei der Hemmung der Serotoninaufnahme in Thrombozyten durch die Aminoadamantanderivate D 176 und D 178 wurden Konzentrationen gewählt, die nicht ausreichten, eine 5-HT-Freisetzung auszulösen (s. Abb. 3 und 4). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach LINEWEAVER-BURK (1934) und DIXON (1953).

### 7.1 Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176)

Zur Hemmung der Serotoninaufnahme in die Thrombozyten wurden Konzentrationen von D 176 zwischen $10^{-5}$ M und $10^{-4}$ M gewählt. Die ($^{14}$C)5-HT-Konzentration variierte zwischen $10^{-7}$ M und 2,3 x $10^{-6}$ M. Nach Berechnung der Regression für die Geraden wur-

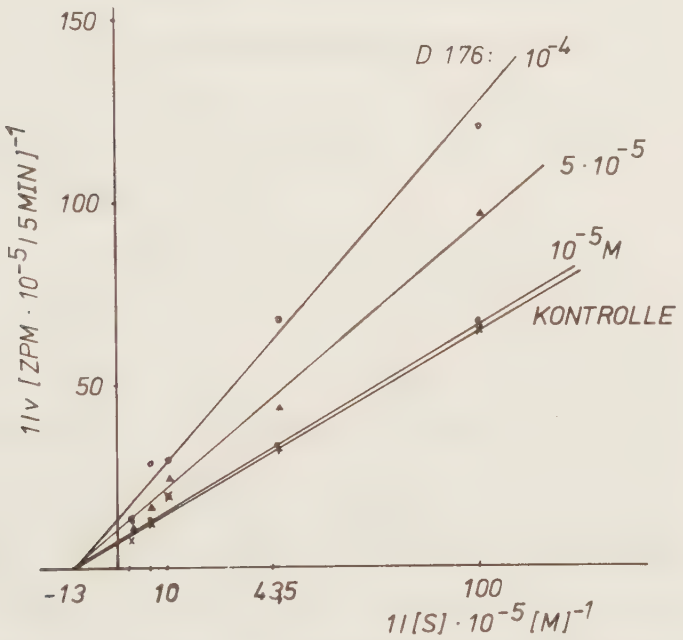



Abb. 10: Aufnahmehemmung von ($^{14}$C)5-HT in menschliche Thrombozyten durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176)

Auftragung nach LINEWEAVER-BURK. Die ($^{14}$C) 5-HT-Inkorporation wurde durch die angegebenen Konzentrationen an D 176 gehemmt. Sonstige Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 9 angegeben. Die Werte wurden um den unspezifischen Anteil der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert einen Einzelversuch.

den sie nach LINEWEAVER-BURK aufgetragen und der $K_I$-Wert nach der Formel $K_I = i\ (\frac{v}{vi} - 1)^{-1}$ aus dem Diagramm berechnet (Abb. 10). Es ergab sich für die drei Hemmstoffkonzentrationen ein mittlerer $K_I$-Wert von $1{,}2 \times 10^{-4}$ M. Die Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme durch D 176 war vom nicht-kompetitiven Typ, wie auch die Auftragung nach DIXON zeigte. Dort ergab sich aus dem Schnittpunkt der aufgetragenen Serotoninkonzentrationsgeraden mit der x-Achse ein $K_I$-Wert von

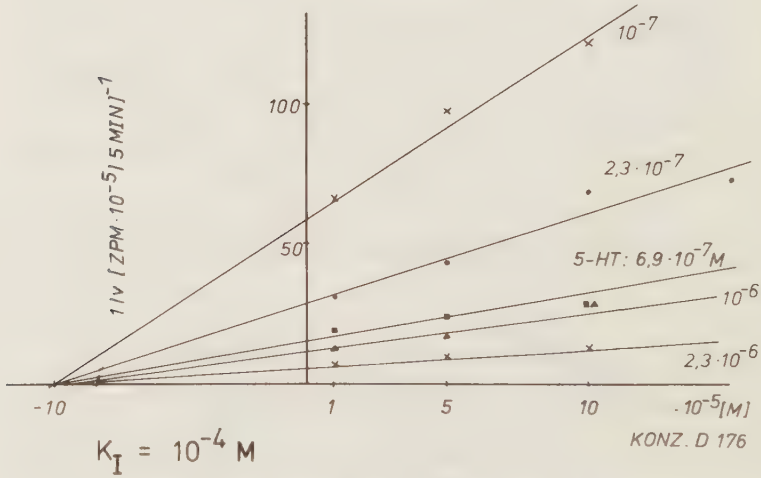



Abb. 11: Aufnahmehemmung von ($^{14}$C)5-HT in menschliche Thrombozyten durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176)

Auftragung nach DIXON. Die ($^{14}$C)5-HT-Inkorporation wurde durch die angegebenen Konzentrationen an D 176 gehemmt. Sonstige Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 9 angegeben. Die Werte wurden um den unspezifischen Anteil der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert einen Einzelversuch.

$10^{-4}$ M, zuvor wurde die lineare Regression berechnet. Aus dem LINEWEAVER-BURK-Diagramm errechneten sich folgende prozentuale Hemmungen der Serotoninaufnahmegeschwindigkeit (in diesem Versuch: 0,2 nMol 5-HT/$10^9$ Thrombozyten/Minute) für D 176:

| | |
|---|---|
| $10^{-5}$ M | 4,4 % |
| 5 x $10^{-5}$ M | 31,6 % |
| $10^{-4}$ M | 49,2 % |

7.2 Hemmung der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178)

Zur Hemmung der Serotoninaufnahme in die Thrombozyten wurden D 178-Konzentrationen zwischen $10^{-6}$ M und 5 x $10^{-5}$ M gewählt, Serotoninkonzentrationen zwischen $10^{-7}$ M und 2,3 x $10^{-6}$ M. Das Butylderivat des 1-Aminoadamantans erwies sich als stärkerer Hemmstoff als das Methylderivat (s. 7.1). Die Hemmung war ebenfalls vom nicht-kompetitiven Typ (Abb. 12 und 13). Die Serotoninaufnahmegeschwindigkeit, ermittelt aus dem LINEWEAVER-BURK-Diagramm, betrug in diesem Versuch 0,21 nMol 5-HT/$10^9$ Thrombozyten/Minute. Ihre prozentuale Hemmung durch D 178 ergab sich wie folgt:

| | |
|---|---|
| $10^{-6}$ M | 10,5 % |
| 5 x $10^{-6}$ M | 22,3 % |
| $10^{-5}$ M | 34,6 % |

Die Auftragung nach DIXON zeigte einen $K_I$-Wert von $10^{-5}$ M.

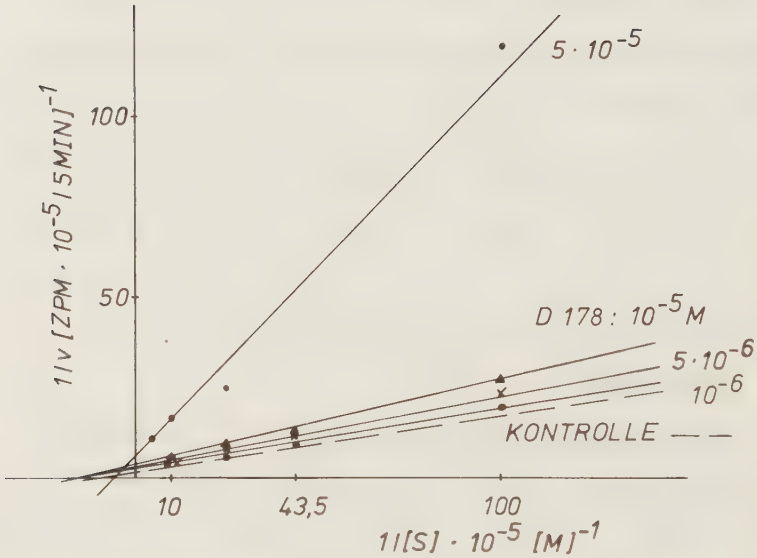



Abb. 12: Aufnahmehemmung von ($^{14}$C)5-HT in menschliche Thrombozyten durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178)

Auftragung nach LINEWEAVER-BURK. Die ($^{14}$C)5-HT-Inkorporation wurde durch die angegebenen Konzentrationen an D 178 gehemmt. Sonstige Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 9 angegeben. Die Werte wurden um den unspezifischen Anteil der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert einen Einzelversuch.

Aus dem LINEWEAVER-BURK-Diagramm ließ sich für die aufgetragenen Hemmstoffkonzentrationen ein mittlerer $K_I$-Wert von 1,3 x $10^{-5}$ M ermitteln. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Freisetzungsreaktionen (Abb. 4) fand bei 5 x $10^{-5}$ M eine geringfügige Ausschüttungsreaktion

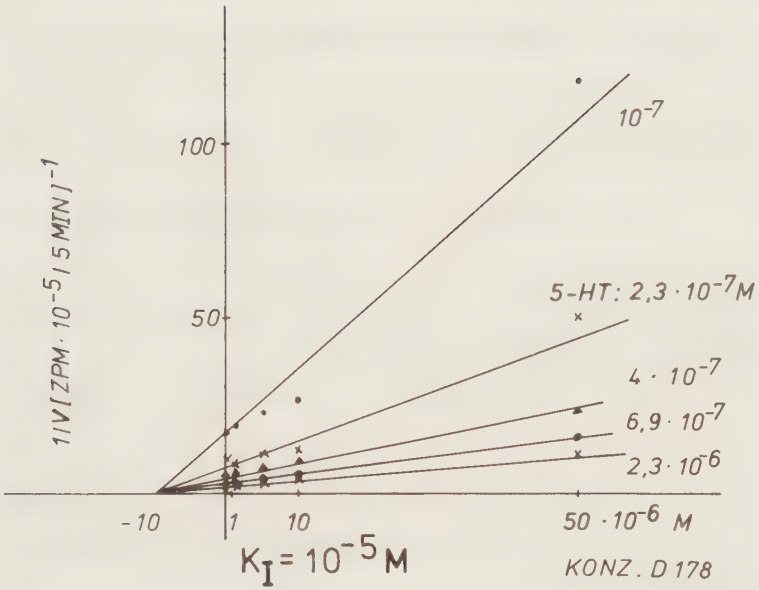



Abb. 13: Aufnahmehemmung von ($^{14}$C)5-HT in menschliche Thrombozyten durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178)

Auftragung nach DIXON. Die ($^{14}$C)5-HT-Inkorporation wurde durch die angegebenen Konzentrationen an D 178 gehemmt. Sonstige Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 9 angegeben. Die Werte wurden um den unspezifischen Anteil der ($^{14}$C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert einen Einzelversuch.

statt (Abb. 12).

## 8. Untersuchungen zur Hemmung der Glykolyse und des Elektronentransportes

Eine Suspension menschlicher Thrombozyten, die zu-

vor im PRP ($^{14}$C)5-HT inkorporiert hatten (s. unter B 5.), wurden 30 Minuten bei 37°C mit drei Hemmstoffkombinationen aus Monojodacetat und Natriumcyanid (H, s. Le-

Tabelle 2: Ergebnisse zur Hemmung der Glykolyse und des Elektronentransportes durch Monojodacetat und Natriumcyanid in menschliche Thrombozyten

D 176, 5 x $10^{-3}$ M

| Hemmst.-komb.* | Serotonin | ATP | ADP |
|---|---|---|---|
| $H_1$ | +7,1 ± 3,1 | +3,9 ± 4,3 | +5,2 ± 2,9 |
| $H_2$ | -1,3 ± 2,2 | -3,7 ± 2,2 | +5,4 ± 6,3 |
| $H_3$ | -0,6 ± 4,2 | +2,8 ± 2,0 | +6,6 ± 2,7 |

D 178, 5 x $10^{-4}$ M

| Hemmst.-komb.* | Serotonin | ATP | ADP |
|---|---|---|---|
| $H_1$ | +6,7 ± 4,8 | +3,9 ± 4,3 | +5,2 ± 2,9 |
| $H_3$ | +4,5 ± 2,6 | -3,1 ± 1,4 | +5,4 ± 6,3 |
| $H_3$ | +4,9 ± 4,3 | +12,9 ± 3,9 | +6,6 ± 6,8 |

Alle Werte sind in % ± $s_{\bar{x}}$ angegeben, für Serotonin (n) = 4, für ATP und ADP (n) = 3. Sie stellen die Differenzbeträge zwischen den Prozentwerten der Freisetzungsreaktionen an menschlichen Thrombozyten dar, die einmal nur mit 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) bzw. 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) inkubiert wurden (30 Minuten bei 37°C), zum anderen zuvor mit einer der drei folgenden Hemmstoffkombinationen (H) vorinkubiert worden waren (30 Minuten bei 37°C):
$H_1$ : NaCN $10^{-2}$ M, Monojodacetat 5 x $10^{-3}$ M
$H_2$ : NaCN 5 x $10^{-3}$ M, Monojodacetat 5 x $10^{-3}$ M
$H_3$ : NaCN $10^{-2}$ M, Monojodacetat 5 x $10^{-3}$ M
Eine Hemmung der Freisetzungsreaktion in Bezug zur Kontrollreaktion wurde mit - bezeichnet, eine Verstärkung mit +. * Hemmst.-komb. ... Hemmstoffkombination

gende Tab. 2) inkubiert. Danach wurde mit 1-Amino-3-methyladamantan (D 176), 5 x $10^{-3}$ M, und mit 1-Amino-3-butyladamantan (D 178), 5 x $10^{-4}$ M, eine Freisetzungsreaktion durch weiteres 30-minütiges Inkubieren bei 37°C ausgelöst. Als Berechnungsgrundlage dienten Kontrollen, die 60 Minuten lang nur mit Hemmstoff behandelt worden waren ($TR_{60\text{-Min.-Kontrolle}}$, s. Abschnitt B, ANHANG). Die Untersuchung zur Hemmbarkeit der Freisetzungsreaktion durch Blockade der Glykolyse und des Elektronentransportes ließ im Vergleich mit Freisetzungsreaktionen ohne Hemmstoffvorinkubation keine Hemmung erkennen (Tab. 2). Die 60-Minuten-Kontrollen zeigten einen beträchtlichen Verlust an Serotonin, ATP und ADP; die Höhe dieses Verlustes war anscheinend von der Stärke

Tabelle 3: Verlust von Serotonin, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch Inkubation mit Monojodacetat und Natriumcyanid

| Hemmstoff komb. | Serotonin | ATP | ADP |
|---|---|---|---|
| $H_1$ | 62,5 % | 47,6 % | 49,6 % |
| $H_2$ | 63,3 % | 39,4 % | 37,8 % |
| $H_3$ | 55,1 % | 38,4 % | 34,8 % |

60-minütige Inkubation menschlicher Thrombozytensuspension bei 37°C mit den Hemmstoffkombinationen $H_1$, $H_2$, $H_3$ (s. Legende Tab. 2). Verlustwerte von Serotonin, ATP und ADP in % des Gesamtgehaltes. Durchschnittswerte aus 4 Versuchen für Serotonin, aus 3 Versuchen für ATP/ADP.

der Hemmstoffkonzentration, mit der inkubiert wurde, abhängig (Tab. 3). In Tabelle 2 sind die Differenzbeträge zwischen den Prozentwerten der Freisetzungsreaktionen mit und ohne vorherige Hemmstoffinkubation angegeben. Für beide Substanzen, D 176 und D 178, lagen sie im Bereich der Schwankungsbreite der Versuche.

9. Lactatdehydrogenase-Messung

Nach Durchführung einer Freisetzungsreaktion, wie unter 1.1 und 1.2 beschrieben, mit 1-Amino-3-methyladamantan (D 176), 5 x $10^{-3}$M, bzw. mit 1-Amino-3-butyladamantan (D 178), 5 x $10^{-4}$ M, (30 Minuten bei 37°C) wurde LDH nach Abzentrifugieren der Thrombozyten im Überstand der Proben gemessen. Zum Vergleich diente eine durch

Tabelle 4: LDH-Aktivität im Thrombozytenüberstand nach Auslösung der Freisetzungsreaktion durch D 176 und D 178

| SEROTONIN | SEROTONINFREISETZUNG | LDH IM ÜBERSTAND |
|---|---|---|
| D 176<br>5 x $10^{-3}$ M | 56,1 % (3) | 11,0 mU/ml |
| D 178<br>5 x $10^{-4}$ M | 86,0 % (2) | 20,8 mU/ml |
| Lysierte Thrombozyten | + | 100,8 mU/ml |

Mit 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert, danach die LDH nach Abzentrifugieren der Thrombozyten im Überstand bestimmt. (n) = Zahl der Proben. + = nicht bestimmt

Frieren (30 Minuten bei -25°C) und Wiederauftauen zerstörte Thrombozytensuspension (Tab. 4). Die LDH-Messung der mit D 176 behandelten Probenüberstände zeigte um die Hälfte kleinere Aktivitäten als die Messung der mit D 178 inkubierten Proben, so daß eine gröbere Membranschädigung durch D 178 nicht ganz sicher ausgeschlossen werden konnte.

10. Elektronenmikroskopie

Thrombozyten von Mensch und Kaninchen wurden 30 Minuten bei 37°C mit 1-Amino-3-butyladamantan (D 178), $10^{-3}$ M, inkubiert und die 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung gemessen, wie unter B,5. und B,6. angegeben. Anschließend wurden die Thrombozytenrückstände fixiert und kontrastiert und elektronenmikroskopisch untersucht. D 178 setzte sowohl aus Menschen- wie aus Kaninchen-Thrombozyten ca. 90 % des Gesamt-($^{14}$C)5-HT- und ca. 50 % des Adeninnukleotidgehaltes frei. Zum Vergleich sind in Tabelle 5 die Kontrollfreisetzungen angegeben. Auf den elekronenmikroskopischen Aufnahmen konnten keine gröberen Membranschäden durch D 178 beobachtet werden. Die semiquantitative Auswertung der Anzahl der Serotoninspeicherorganellen bei einem Abbildungsmaßstab von 1:4600 bzw. 1:7000 ergab für nicht mit D 178 behandelte menschliche Thrombozyten 66 "very dense bodies"/250 Thrombozyten;

Tabelle 5: Anzahl der 5-HT-Speicherorganellen in menschlichen und Kaninchen-Thrombozyten nach der durch D 178 induzierten Freisetzungsreaktion

Freisetzung aus Kaninchen-Thrombozyten:

| Probe | 5-HT | ATP | ADP | 5-HT-Org./* 250 Thr. |
|---|---|---|---|---|
| Kontrolle | 7,1 % | 13,5 % | 11,8 % | 300 |
| D 1 | 98,8 % | 54,5 % | 58,4 % | 41 |

Freisetzung aus menschlichen Thrombozyten

| Probe | 5-HT | ATP | ADP | 5-HT-Org./* 250 Thr. |
|---|---|---|---|---|
| Kontrolle | 10,7 % | 13,7 % | 6,9 % | 66 |
| D 1 | 98,3 % | 54,5 % | 62,5 % | 12 |

Inkubation der Thrombozyten vom Mensch und Kaninchen bei 37°C in GAINTNER-Lösung mit 1-Amino-3-butyladamantan (D 178), $10^{-3}$ M. Semiquantitative Auswertung der Anzahl der Speicherorganellen durch Auszählen der "very dense bodies" und Thrombozyten bei einer Vergrößerung von 1:4600 und 1:7000. Die 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung wurde nicht um die aufgeführten Kontrollwerte korrigiert.

durch Inkubation mit D 178 verringerte sich dieser Wert auf 12 Speicherorganellen/250 Thrombozyten. Die entsprechenden Werte beim Kaninchen betrugen 300 Organellen/250 Thrombozyten für unbehandelte Thrombozyten im Vergleich zu 41 Speicherorganellen pro 250 Thrombozyten nach Behandlung mit D 178.

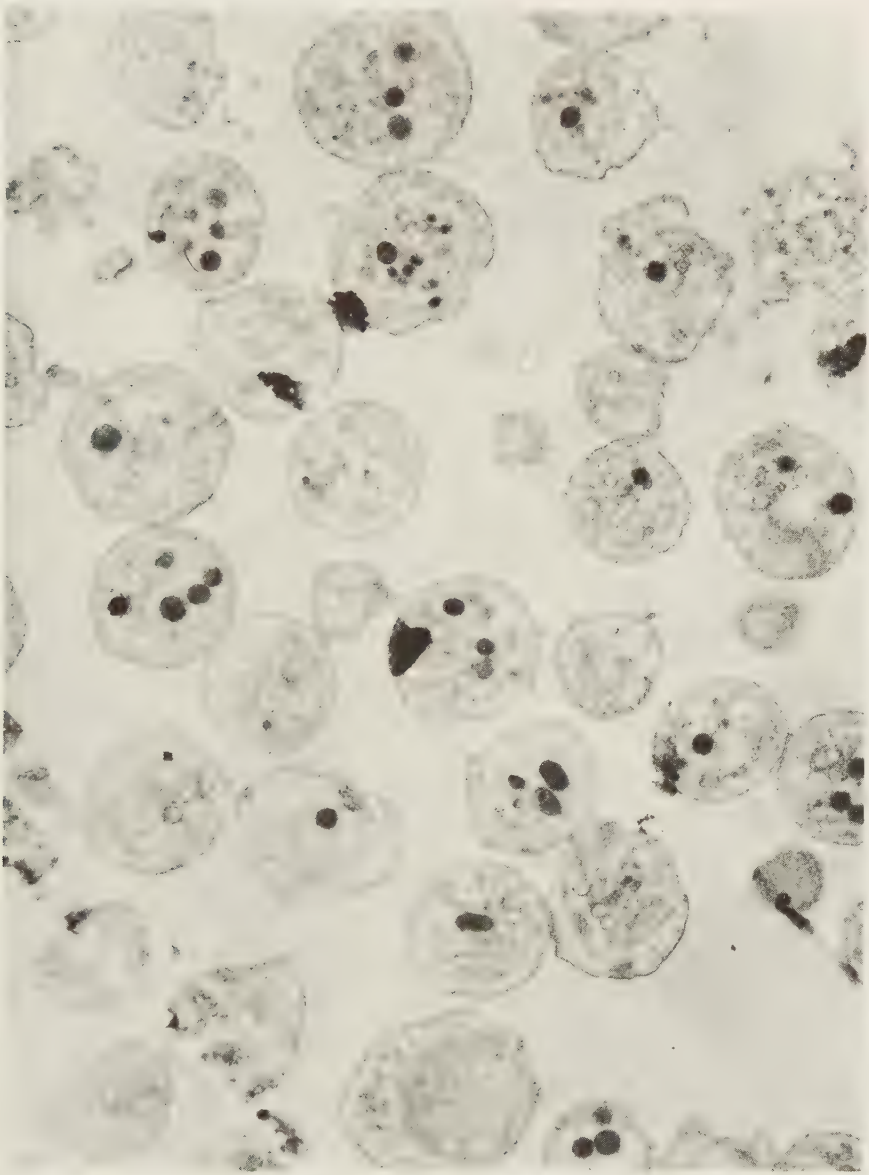


Abb. 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme menschlicher Thrombozyten ohne Behandlung mit D 178 (Kontrolle). Menschliche Thrombozyten wurden 30 Minuten bei 37°C in GAINTNER-Lösung inkubiert, anschließend mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert und mit Uranylacetat kontrastiert.
Abbildungsmaßstab: 1:13.000

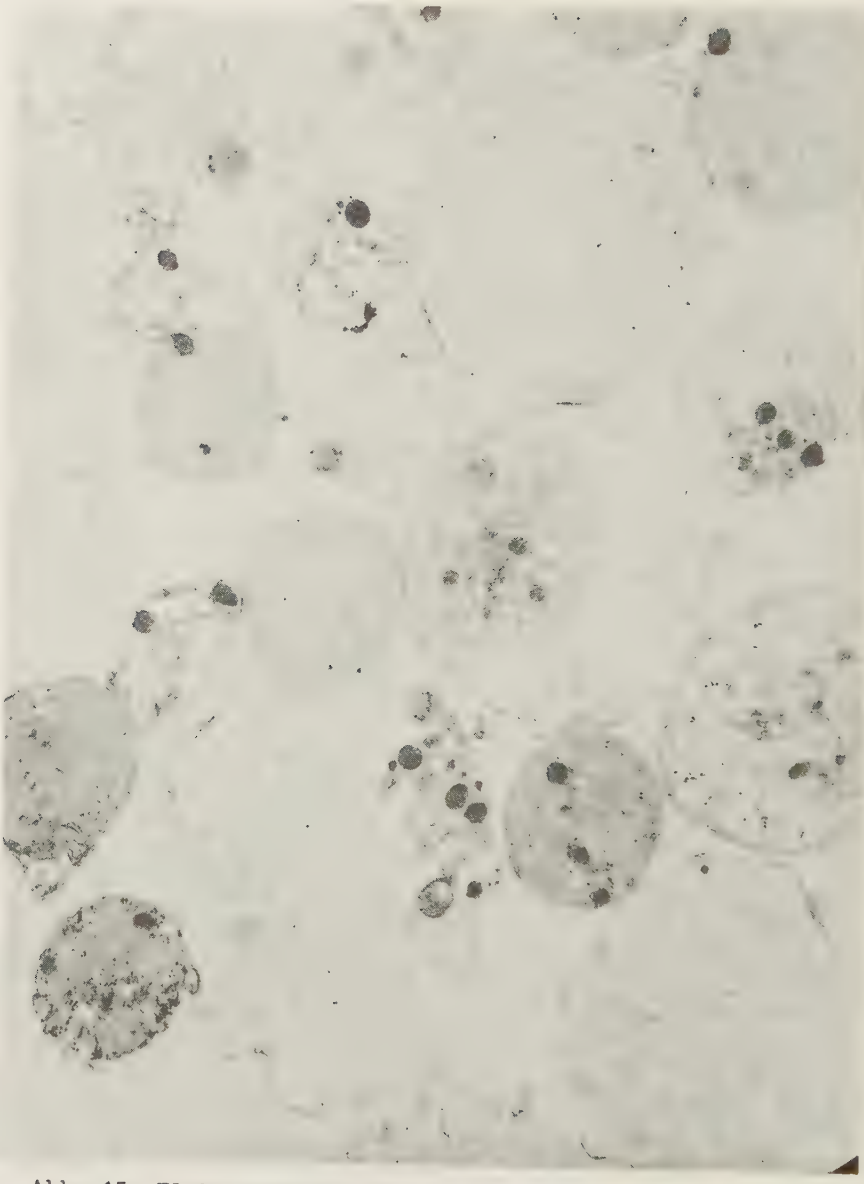


Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme menschlicher Thrombozyten nach Behandlung mit D 178
Menschliche Thrombozyten wurden 30 Minuten bei 37°C in GAINTNER-Lösung mit D 178 ($10^{-3}$ M) inkubiert, anschließend mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert und mit Uranylacetat kontrastiert. Abbildungsmaßstab: 1:21.000
Der Vergleich mit Abb. 14 zeigt eine Verminderung der Serotoninspeicherorganellen. Die

## D. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Derivate des 1-Aminoadamantans, 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) sowie 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) in ihrer Wirkung an menschlichen Thrombozyten untersucht. Gemessen wurde die Hemmbarkeit der Serotoninaufnahme in die Thrombozyten, sowie die Wirkung der beiden Substanzen auf die Freisetzung von Serotonin und Adeninnukleotiden und die Abhängigkeit dieser Freisetzung von verschiedenen Parametern wie Zeit, Temperatur und molarer Konzentration des Wirkstoffes. Weiterhin wurde die Energieabhängigkeit der Freisetzungsreaktion untersucht und mögliche morphologische Veränderungen der Thrombozyten elektronenmikroskopisch erfaßt. Vor der Diskussion der Ergebnisse muß darauf hingewiesen werden, daß sich die Thrombozyten verschiedener Spender unter konstanten Versuchsbedingungen individuell unterschiedlich empfindlich bezüglich der Präparations- und Meßmethodik gezeigt haben. Die große Schwankungsbreite des unterschiedlichen Serotonin- bzw. Adeninnukleotidgehaltes der Thrombozyten ist auch schon länger aus der Literatur bekannt (HARDISTY und STACEY, 1955; BORN et al., 1958).

Im Vergleich zu anderen menschlichen Geweben zeichnen sich die Thrombozyten durch ihren hohen Ge-

halt an Serotonin aus. Sie haben die Fähigkeit, Serotonin auch gegen einen hohen Konzentrationsgradienten, z.B. gegenüber menschlichem Plasma 200 : 1, aktiv aufzunehmen (BORN und GILLSON, 1959) und in den osmiophilen "very dense bodies" zusammen mit Adeninnukleotiden zu speichern (DA PRADA und PLETSCHER, 1968). In dieser Arbeit zeigte die Serotoninaufnahme durch menschliche Thrombozyten, ermittelt im GAINTNER-Inkubationsmedium, in den ersten 5 Minuten eine schnelle, lineare Zunahme, die sich mit Ablauf der Zeit verlangsamte und bei ca 40 Minuten ein Sättigungsplateau erreichte. Der Zeitverlauf der Serotoninaufnahme entspricht der von LEMMER (1973) gefundenen Kurve, in der nach 30 Minuten ein Sättigungsplateau erreicht wird; auch er arbeitete in einem künstlichen Nährmedium mit einer etwas höheren Serotoninkonzentration von 3,5 µM. Durch Inkubation mit einem Serotoninüberschuß im PRP läßt sich der 5-HT-Gehalt der Thrombozyten auf das 2-5-fache des in vivo gefundenen Serotoningehaltes steigern (HARDISTY und STACEY, 1955). Bei einer Serotoninkonzentration von 6,82 µM zeigte dabei die 5-HT-Aufnahme einen ähnlichen Zeitverlauf: die schnelle lineare Zunahme in den ersten 5 Minuten - der Beginn des Sättigungsplateaus wird etwas später erreicht (zwischen 50 und 60 Minuten).

Die 60-minütige Inkubation des PRPs mit radio-

aktiv markiertem 5-HT (2,1 µM) ergab einen exogenen Serotoningehalt der Thrombozyten von 9,3 nMol/$10^9$ Thrombozyten. Dies ist gut vergleichbar mit Werten von HARDISTY und STACEY (1955): 10,8 nMol/$10^9$ Thrombozyten (Inkubationszeit: 75 Minuten, 5-HT-Konzentration: 6,82 µM); mit BORN et al. (1958): 13,0 nMol/$10^9$ Thrombozyten (75 Minuten, 5-HT: 6,8 µM); und mit STACEY (1961): 15,1 nMol/$10^9$ Thrombozyten (60 Minuten, 5-HT: 13 µM). Die zitierten Autoren erfassen auch das endogene Serotonin, dessen Wert nach BORN et al. (1958) 3,4 nMol/$10^9$ Thrombozyten, nach HAACKE und WESEMANN (1977) 4,5 nMol/$10^9$ Thrombozyten beträgt. SZABADOS et al. (1975) wiesen eine beschleunigte 5-HT-Aufnahme nach Inkorporation von N-Acetylneuraminsäure in die Thrombozytenmembran nach: 10,5 nMol/$10^9$ Thrombozyten nach 5 Minuten (5-HT-Konz.: 5 µM).

Wie aus den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der 5-HT-Aufnahme ersichtlich, erfolgt die Serotoninaufnahme in die menschlichen Thrombozyten zu Beginn, d.h. in den ersten 5-10 Minuten, linear. Es handelt sich dabei um einen aktiven, spezifischen Prozeß, der einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik folgt (BORN und GILLSON, 1959). Deshalb wurden sowohl die Ermittlung der MICHAELIS-Konstante, als auch die Hemmversuche zur Serotoninaufnahme mit einer Inkubationszeit von 5 Minuten durchgeführt. Dabei ergab sich im Inkubations-

medium nach GAINTNER et al. (1962) ein $K_M$-Wert von $7,5 \times 10^{-7}$ M. BORN und GILLSON (1959) fanden einen $K_M$-Wert von $3 \times 10^{-7}$ M, LEMMER (1973) einen $K_M$-Wert von $3,8 \times 10^{-7}$ M; allerdings wurden in beiden Fällen die Werte für PRP ermittelt, so daß Plasma anscheinend die 5-HT-Aufnahme begünstigt.

Sowohl das 3-Methyderivat (D 176) als auch das 3-Butylderivat (D 178) zeigten sich als nicht-kompetitive Hemmstoffe der Serotoninaufnahme. Es ermittelte sich für D 176 eine Inhibitorkonstante von $K_I = 1,2 \times 10^{-4}$ M; im gleichen Bereich liegen die $K_I$-Werte der Muttersubstanz 1-Aminoadamantan, $K_I = 1,3 \times 10^{-4}$ M (STÖLTZING, 1977) bzw. $K_I = 1,6 \times 10^{-4}$ M (LEMMER, 1973) und ihres 3-Dimethylderivates (D 145), für das HAACKE und WESEMANN (1977) einen $K_I$-Wert von $5 \times 10^{-4}$ M angeben. Beide Substanzen stellen ebenfalls nicht-kompetitive Hemmstoffe der 5-HT-Aufnahme dar. Als 10-fach stärkerer Hemmstoff erwies sich das Butylderivat (D 178) mit einem $K_I$-Wert von $1,3 \times 10^{-5}$ M; in derselben Größenordnung liegt die Inhibitorkonstante des ebenfalls nicht-kompetitiven Hemmstoffes 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177), $K_I = 1,8 \times 10^{-5}$ M (STÖLTZING, 1977). So zeigt sich, daß mit steigender Kettenlänge des 3-C-Alkylrestes des 1-Aminoadamantans der Hemmeffekt zunimmt. Aus Untersuchungen von WESEMANN und SCHOLLMEYER (1973) sind 1-Aminoadamantan und sein Dimethyl-

derivat (D 145) als nicht-kompetitive Hemmstoffe der Serotoninbindung an synaptische Vesikel und Membranen bekannt. Es werden dafür von WILDENHAHN (1976) Inhibitorkonstanten angegeben (1-Aminoadamantan: $K_I$ = 5,7 x $10^{-5}$ M); D 145: $K_I$ = 9 x $10^{-5}$ M), die den an Thrombozyten gefundenen vergleichbar sind. Es liegt nahe anzunehmen, daß sich D 176 und D 178 in ihrer Wirkung an synaptischen Vesikeln ähnlich verhalten.

MASSINI (1970) zeigte, daß sich bei der Serotoninfreisetzung aus Thrombozyten die Ausschüttung des endogenen 5-HT und des exogenen ($^{14}$C)5-HT, welches zuvor aus dem Inkubationsmedium aufgenommen wurde, gleich verhält. Nach HOLMSEN et al. (1973) bestätigt sich dieser Befund, wobei das zuvor akkumulierte Serotonin die Tendenz zeigt, etwas leichter wieder freigesetzt zu werden. HAACKE und WESEMANN (1977) nehmen an, daß aus dem Inkubationsmedium akkumuliertes Serotonin im gleichen Kompartiment gespeichert wird wie endogenes 5-HT, da sich bei der D 145-induzierten Freisetzungsreaktion beide gleich verhalten. So wurde in dieser Arbeit zur Messung der Serotoninfreisetzung nur zuvor inkorporiertes radioaktiv markiertes ($^{14}$C)5-HT bestimmt.

1-Amino-3-methyladamantan (D 176) setzt aus menschlichen Thrombozyten dosisabhängig zuerst Seroto-

nin, bei höheren Konzentrationen auch die Adeninnukleotide ATP und ADP frei. Als wesentlich stärkere Freisetzungssubstanz erwies sich das 1-Amino-3-butyladamantan (D 178), bei dem ebenfalls für die Adeninnukleotidausschüttung höhere Wirkstoffkonzentrationen erforderlich waren als für die 5-HT-Freisetzung. Bei beiden Substanzen waren 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzungen bis zu 80-90 % des Gesamtgehaltes möglich. Das von HAACKE und WESEMANN (1977) untersuchte Dimethylderivat des 1-Aminoadamantans (D 145) und das Isopropylderivat (D 177) (STÖLTZING, 1977) zeigen ein ganz ähnliches Verhalten und stehen hinsichtlich der zur Auslösung der 5-HT- und Adeninnukleotidfreisetzung erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen zwischen D 176 und D 178 (Abb. 16).

Die Freisetzung von Serotonin und Adeninnukleotiden, die durch D 176 bzw. D 178 ausgelöst wird, zeigt einen relativ langsamen Zeitverlauf. Bei niedrigen Konzentrationen scheint die Freisetzungsreaktion nach 20 - 30 Minuten beendet zu sein, bei höheren Konzentrationen bereits nach 10-20 Minuten. Ein ähnliches Verhalten ist vom D 145 bekannt (HAACKE und WESEMANN, 1977). Auch andere Substanzen bewirken ähnlich langsame Freisetzungen, z.B. das Natriumfluorid (Maximum nach 3-10 Minuten; MÜRER et al., 1974) oder das Fenfluramin (Zeitverlauf der 5-HT-Frei-

setzung bis zu 2 Stunden; BUCZKO et al., 1975).

Die durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) hervorgerufene Serotonin- bzw. auch Adeninnukleotidfreisetzung aus Thrombozyten ist von der Inkubationstemperatur abhängig. Die kritische Mindesttemperatur scheint für D 176 bei 30°C zu liegen. Dies stimmt wiederum überein mit Befunden über das 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) (HAACKE und WESEMANN, 1977). Für das stärkste Freisetzungsreagenz D 178 lag die kritische Mindesttemperatur für die Freisetzungsreaktion tiefer, zwischen Zimmertemperatur (20-22°C) und 30°C.

Untersuchungen über das 1-Aminoadamantan und seine Derivate 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) und 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) (STÖLTZING, 1977) lassen die Vermutung zu, daß zwischen der Länge der Substituentenkette am Aminoadamantanmolekül und der Stärke der Freisetzung von Serotonin und Adeninnukleotiden eine Beziehung besteht. Die Ergebnisse mit D 176 und D 178 (s. C 1.1 und 1.2) fügten sich in diese Annahme: je länger die Seitenkette an der Muttersubstanz 1-Aminoadamantan, desto größer ist die Potenz zur Induktion einer Freisetzungsreaktion (Abb. 16). D 178, das Derivat mit der längsten Seitenkette, stellte den stärksten Induktor der Freisetzungsreaktion dar; die

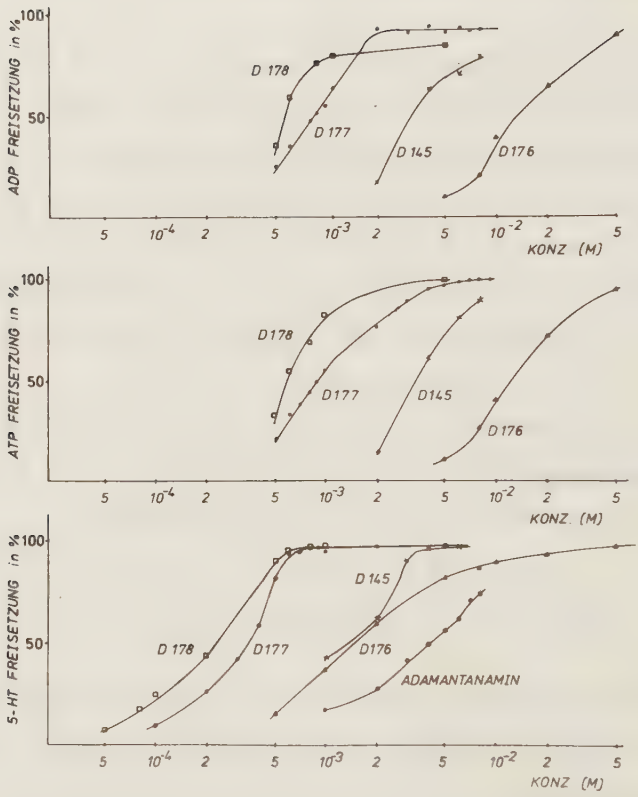



Abb. 16: Vergleich der Freisetzungsreaktion von ($^{14}$C) 5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Aminoadamantan und seine Derivate

D 176 : 1-Amino-3-methyladamantan
D 145 : 1-Amino-3.5-dimethyladamantan
D 177 : 1-Amino-3-isopropyladamantan
D 178 : 1-Amino-3-butyladamantan
Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C. Die Auftragung der Freisetzung erfolgte in % des ($^{14}$C)5-HT-, bzw. ATP/ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Abzug der Spontanfreisetzung.

($^{14}$C)5-HT-Ausschüttung begann bereits bei 5 x $10^{-4}$ M, gefolgt von D 177 (Isopropylderivat), D 145 (Dimethylderivat) und D 176 (Methylderivat). Diese Rangordnung blieb auch bei der Freisetzung der beiden Adeninnukleotide ATP und ADP gewahrt, jedoch lagen die für die jeweilige prozentuale Ausschüttung erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen bei D 176 und D 178 um ca eine Zehnerpotenz, bei D 145 und D 177 (STÖLTZING, 1977) ca. eine halbe Zehnerpotenz höher als bei der ($^{14}$C)5-HT-Freisetzung. Die Muttersubstanz, das 1-Aminoadamantan, stellte, wie aus der Abbildung ersichtlich, den schwächsten Induktor der Serotoninfreisetzung dar, eine ATP/ADP-Ausschüttung wird nicht bewirkt.

Der in dieser Arbeit gefundene Gehalt menschlicher Thrombozyten an Adenosintriphosphat (ATP) beträgt 64 nMol/$10^9$ Thrombozyten und an Adenosindiphosphat (ADP) 39 nMol/$10^9$ Thrombozyten. Beide Werte sind mit den in der Literatur angegebenen vergleichbar. BORN fand schon 1958, daß der ATP-Gehalt der Thrombozyten stark schwankt, bis um das 2,8-fache; er gab als Durchschnittswert 43 nMol/$10^9$ Thrombozyten an; HOLMSEN und DAY (1971) publizierten Werte von 40-60 nMol/$10^9$ Thrombozyten, HAACKE und WESEMANN (1977) geben 57 nMol/$10^9$ Thrombozyten an. Für den ADP-Gehalt geben HAACKE und WESEMANN (1977) 33 nMol/$10^9$ Thrombozyten, HOLMSEN und DAY (1971) 20-40 nMol/$10^9$ Thrombozyten an. Ebensolche

Schwankungen zeigen sich bei dem Quotienten Gesamt-ATP : Gesamt-ADP in intakten Thrombozyten. In dieser Arbeit betrug der Quotient 1,7 : 1. HAACKE und WESEMANN (1977) gaben 1,8 : 1 an. Sie verwendeten dieselbe Modifikation der Luciferin-Luciferase-Methode nach HOLMSEN et al. (1966, 1971), die auch in der vorliegenden Arbeit benutzt wurde. In MAUPINs Monographie über Thrombozyten (1969) werden u.a. ATP/ADP-Relationen von 3,1 : 1 (GROSS) und 5 : 1 (SCHMITZ) angegeben. Nach der Freisetzung durch D 176 und D 178 findet man in den Überständen ein Verhältnis des freigesetzten ATPs zu ADP von 1,0. Die Änderung des ATP/ADP-Verhältisses von 1,7 in intakten Thrombozyten zu 1,0 in den Überständen nach der Freisetzung spricht gegen eine Zellzerstörung und für eine Freisetzungsreaktion (HAACKE und WESEMANN, 1977); sie fanden einen Quotienten von 0,9 in den Überständen; HOLMSEN und DAY (1969) von 0,78. Nach Inkubation der Thrombozyten im PRP mit radioaktiv markiertem Serotonin (2,1 µM, 60 Minuten) wurde ein Verhältnis von ATP zu exogenem, d.h. aufgenommenem Serotonin, von 6,9 gefunden. Bei BORN et al. (1958) wird dieses Verhältnis mit 3,2 angegeben. Dies ist keine Diskrepanz, da er das endogene Serotonin miterfaßte und mit einer höheren Serotoninkonzentration (6,8 µM, 75 Minuten) inkubierte. Während der Freisetzungsreaktion durch D 176 und D 178 verschwinden ca. 30 % des ATPs, ohne

freigesetzt zu werden. HAACKE und WESEMANN (1977) fanden bei der Freisetzung durch D 145 einen ATP-Schwund von ca 15 %. Offensichtlich handelt es sich um einen ATP-Abbau aus dem metabolischen ATP-Pool, welches später zu Inosin und Hypoxanthin abgebaut wird und die Energie für die Freisetzungsreaktion liefert (HOLMSEN und DAY, 1969). Sie geben den ATP-Verlust bei der Freisetzungsreaktion durch Thrombin mit 20 % an.

Um abzusichern, daß die ($^{14}$C)5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) nicht auf Zerstörung der Thrombozyten beruht, wie dies zum Beispiel beim Imipramin der Fall ist (GOODE und MELTZER, 1974), wurde nach Durchführung einer Freisetzungsreaktion die LDH-Aktivität im Überstand gemessen. Dabei zeigt sich durch D 176 nur eine geringe LDH-Aktivität im Überstand, verglichen mit der hohen Aktivität im Überstand durch Frieren lysierter Thrombozyten. Nach der durch D 178 induzierten Freisetzungsreaktion lagen die LDH-Aktivitäten höher, jedoch kann dies nicht im Sinne eines durch die Wirksubstanz induzierten Membranschadens interpretiert werden, da während der Aufbereitung der Thrombozyten durch Waschen und mehrmaliges Zentrifugieren immer eine mechanische Schädigung eines Teils der Zellen auftreten kann und

deshalb miteinkalkuliert werden muß. Nach den Ergebnissen sind zumindest gröbere Membranschäden als Ursache der 5-HT-, bzw. ATP/ADP-Freisetzung unwahrscheinlich, können jedoch beim D 178 nicht ganz sicher ausgeschlossen werden.

In einem Versuch wurde die durch D 178 hervorgerufene Serotonin- und ATP/ADP-Freisetzung aus menschlichen Thrombozyten und solchen vom Kaninchen mit den elektronenmikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen verglichen. Die Zahl der Serotoninspeicherorganellen, in denen 5-HT und ATP in micellarer vorliegen (BERNEIS et al., 1970), verminderte sich nach Behandlung durch D 178 auf ca. die Hälfte der Kontrolle. Die Thrombozytenmembranen boten keinen Anhalt für eine gröbere Schädigung. Bei einem zugrundegelegten Thrombozytenradius von 1 $\mu$ ergeben sich für unbehandelte menschliche Thrombozyten 66 Organellen/ 800 $\mu^2$ Thrombozytenfläche, bei Kaninchenthrombozyten 300 Organellen/800 $\mu^2$ Thrombozytenfläche. Dies ermöglicht einen groben Vergleich mit Werten von DA PRADA et al. (1967) und TRANZER et al. (1966). Sie fanden bei unbehandelten Kaninchenthrombozyten ungefähr 360 - 380 5-HT-Speicherorganellen/800 $\mu^2$ Thrombozytenfläche. TRANZER et al. (1966) gibt für unbehandelte menschliche Thrombozyten ca. 50 5-HT-Speicherorganellen/800 $\mu^2$ Thrombozytenfläche an. Allerdings

ist zu bedenken, daß sich die zitierten Literaturwerte aus mehreren Auszählungen an verschiedenen Schnitten ermitteln, während in dieser Arbeit nur jeweils ein Schnitt ausgezählt wurde. Dennoch läßt die semiquantitative Auswertung erkennen, daß der durch D 178 bewirkten Freisetzungsreaktion eine Abnahme der Serotoninspeicherorganellen parallel geht.

Durch den Glykolysehemmstoff Monojodacetat und den Hemmstoff der Atmungskette Natriumcyanid wurde die Energiegewinnung der Thrombozyten gehemmt; bei der anschließenden Induktion einer Freisetzungsreaktion durch D 176 bzw. D 178 erwies sich diese als durch die Hemmstoffvorinkubation nicht beeinflußt. HAACKE und WESEMANN (1977) fanden jedoch eine Beeinträchtigung der D 145-induzierten Freisetzungsreaktion durch die oben genannte Hemmstoffkombination und somit eine Energieabhängigkeit des Prozesses. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist schwierig zu erklären, da die Hemmung des Energiestoffwechsels der Thrombozyten durch metabolische Inhibitoren zumindest zwei zu berücksichtigende Effekte auslöst: sowohl eine Hemmung der Rückresorption, als auch eine Hemmung der Release-Reaktion. Zum einen verlieren die Thrombozyten während der einstündigen Hemmstoffinkubation bis zu 70 % ihres 5-HT-Gehaltes, den sie auf Grund von Energiemangel nicht rückresorbieren können, so daß eine 5-HT-Ausschüttung vorge-

täuscht wird, ohne daß D 178 hinzugefügt wurde. Zum anderen steht durch die Behandlung mit metabolischen Inhibitoren für die nachfolgende Aminoadamantan-induzierte Freisetzung weniger Energie zur Verfügung, so daß die 5-HT-, ATP- und ADP-Ausschüttung gehemmt sein sollte. Erst wenn durch genauere Untersuchungen der Kinetik der Wiederaufnahme passiv diffundierenden Serotonins in Gegenwart der verschiedenen metabolischen Hemmstoffe dieser Teilschritt quantitativ zu bestimmen ist, wird ein Vergleich der Resultate verschiedener Autoren möglich sein. Außerdem ist zu bedenken, daß die Vorinkubation mit der Hemmstoffkombination Monojodacetat/Natriumcyanid in steigender Konzentration eine Schädigung der Thrombozytenmembran bewirken könnte. Darauf weist der bei 60-minütiger Hemmstoffinkubation auftretende Adeninnukleotidverlust hin (ca. 30 - 50 %). So wird deutlich, daß zur genaueren Untersuchung der Energieabhängigkeit der Aminoadamantan-induzierten Freisetzungsreaktion primär Vorbedingungen gefunden werden müssen, die sicher einen Membranschaden am Thrombozyten ausschließen und trotzdem eine maximale Hemmung der Energiegewinnung garantieren.

Bei der Frage nach dem Wirkungsmechanismus der durch D 176 und D 178 bewirkten dosisabhängigen, nichtkompetitiven 5-HT-Aufnahmehemmung in menschliche

Thrombozyten ist folgendes zu überlegen: die Muttersubstanz 1-Aminoadamantan und ihre Derivate stehen noch nicht in radioaktiv markierter Form zur Verfügung, um auf einfache Weise zu klären, ob ihr Angriffspunkt im Zellinnneren oder an der Membran des Thrombozyten liegt. Außerdem ist bisher nicht untersucht worden, ob die 5-HT-Aufnahmehemmung spezifisch ist oder ob sie auch für andere biogene Amine gilt, z.B. Adrenalin, Histamin oder Dopamin. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen könnte man sich die Wirkung der beiden Aminoadamantanderivate als eine Interaktion mit einem postulierten, in der Membran gelegenen Rezeptor vorstellen, welche auf noch unbekanntem Wege den 5-HT-Aufnahmemechanismus bis zur völligen Stilllegung behindert. Dabei muß sich der Wirkungsmechanismus von dem des Imipramins unterscheiden, von dem sicher bekannt ist, daß es seinen Angriffspunkt an der Thrombozytenmembran hat (PLETSCHER und TRANZER, 1967; TRANZER et al., 1966), denn Imipramin ist ein kompetitiver Hemmstoff der 5-HT-Aufnahme (STACEY, 1961). Die steigende Hemmpotenz der Aminoadamantanderivate mit längerer Seitenkette könnte durch bessere Lipidlöslichkeit in der Membran bedingt sein. Allerdings könnte auch eine Beeinflussung des 5-HT-Aufnahmeprozesses durch Änderung bestehender Ionenverhältnisse oder Beeinflussung der $Na^+$-$K^+$-ATPase eine Rolle spielen.

Während es bei niedrigen Konzentrationen an D 176 bzw. D 178 zu einer Hemmung der 5-HT-Aufnahme in die Thrombozyten kommt, erfolgt bei steigenden Wirkstoffkonzentrationen zunächst eine Serotoninausschüttung ohne gleichzeitige, dann mit gleichzeitiger Adeninnukleotidfreisetzung. Die 5-HT-Freisetzung ohne begleitende Adeninnukleotidausschüttung könnte durch spontan freigesetztes, nicht wiederaufgenommenes Serotonin und/oder durch Erleichterung der passiven Diffusion verursacht werden. Außer diesem Angriffspunkt an der Membran könnte man sich bei einer Aufnahme der Aminoadamantane ins Thrombozyteninnere deren Wirkung auch als Interferenz mit der Micellarstruktur der Serotonin-Speicherorganellen vorstellen.

Erfolgt gleichzeitig mit der Serotonin-Freisetzung eine Adeninnukleotidausschüttung, wie es bei den höheren Konzentrationen der Fall ist, so liegt es nahe, die D 176- und D 178-Wirkung als Release-Reaktion im Sinne von MÜRER et al. (1974) zu interpretieren. Dies wird auch von HAACKE und WESEMANN (1977) für die ganz ähnliche Wirkung des D 145 angenommen.

Die Thrombozyten-Release-Reaktion hat nach HOLMSEN et al. (1969) folgende Kriterien: 1. Die freigesetzten Substanzen sind (soweit bisher über-

prüft) in den Granula der Thrombozyten lokalisiert, und zwar sowohl in den alpha-Granula, als auch in den "dense granula" mit "bull-eyes" und in den "very dense granula". 2. Substanzen, die entweder im Zytoplasma, den Mitochondrien oder in Membranen lokalisiert sind, bleiben bei der Release-Reaktion zurück. 3. Die maximale Freisetzung wird bei 37°C innerhalb von 60 Sekunden erreicht; diese Forderung ist laut MÜRER et al. (1974) nicht mehr haltbar. 4. Der Prozeß ist energieabhängig. Die Energie wird durch Glykolyse und oxidative Phophorylierung bereitgestellt. 5. Nach der Release-Reaktion nimmt der Thrombozyt einige seiner bekannten Funktionen wieder beinahe normal wahr. 6. In vielen Fällen wird der Prozeß durch extrazelluläres Calcium gefördert.

Andererseits könnte die Wirkung der Aminoadamantanderivate auf einem Membraneffekt beruhen, etwa derart, daß mit längerer Seitenkette und damit möglicherweise steigender Lipidlöslichkeit zunächst 5-HT, mit zunehmender Porengröße auch ATP/ADP ausströmen, und daß es mit weiterer Steigerung der Wirkstoffkonzentration zu einer Zellzerstörung kommt. Für die Annahme, daß es sich bei der 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung durch D 176 und D 178 aus menschlichen Thrombozyten um eine Release-Reaktion handelt, spricht die Konzentrations-, Zeit- und Temperaturab-

hängigkeit der Reaktion. Daß die micellaren 5-HT-ATP-Konplexe in den "very dense bodies" bei niedrigeren Temperaturen größere Stabilität aufweisen (BERNEIS et al., 1970), könnte die geringere Wirksamkeit der beiden Aminoadamantane bei niedrigen Temperaturen erklären, wobei bei D 178 als dem stärksten Freisetzungs-Induktor dieser Effekt zu niedrigeren Temperaturen verschoben scheint. Einschränkend muß jedoch bedacht werden, daß die Temperaturabhängigkeit der Reaktion auch durch physiko-chemische Veränderungen an der Organellenmembran bedingt sein kann und nicht unbedingt einen aktiven energieabhängigen Prozeß beweist (DA PRADA und PLETSCHER, 1968). Die Änderung des Quotienten ATP : ADP in intakten Thrombozyten vor der Freisetzung und in den Überständen danach läßt einen Membraneffekt unwahrscheinlich erscheinen und spricht für die Entleerung der "very dense bodies". Dies zeigt sich auch elektronenmikroskopisch in der Verminderung der 5-HT-Speicherorganellen nach Behandlung mit D 178; außerdem erschienen die Thrombozytenmembranen intakt. Die relativ niedrigen LDH-Aktivitäten im Überstand nach der Freisetzungsreaktion durch D 176 und, mit Einschränkung auch durch D 178, ließen auch keinen gröberen Membranschaden erwarten. Obwohl die Frage nach der Energieabhängigkeit der Reaktion auf Grund der Versuche mit metabolischen Inhibitoren der Glykolyse und des Elektronentransportes offen bleiben

muß, spricht der bei der Freisetzung beobachtete ATP-Verbrauch ebenfalls dafür, daß durch die beiden Aminoadamantane eine Release-Reaktion induziert wird. Mit D 176 und D 178 konnte in dieser Arbeit eine fast 90 %ige Ausschüttung der Adeninnukleotide bewirkt werden, wobei jedoch bei dem verwendeten Berechnungsmodus der Anteil des bei der Reaktion verbrauchten ATPs nicht eingeht. Bei Berücksichtigung dieses Anteils ergibt sich eine ungefähre Gesamt-Adeninnukleotid-Freisetzung (ATP + ADP) von ca 80 %, die etwas höher liegt als die ca 60 %ige ATP/ADP-Freisetzung, die von HOLMSEN und DAY (1969) in ihrer "Pool Theorie" angegeben wird; nach dieser Theorie existieren im Thrombozyten 3 Adeninnukleotidkompartimente: ein "storage pool" (ca 60 %) in den Speicherorganellen, ein "release energy pool" (ca 10 %), der die für die Freisetzungsreaktion benötigte Energie liefert, und ein "Basisstoffwechsel-Pool" (ca 30 %).

Zusammenfassend muß man sowohl für die durch 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) als auch durch 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) induzierte Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin, Adenosintriphosphat und Adenosindiphophat aus menschlichen Thrombozyten eine Release-Reaktion mit langsamem Zeitverlauf ohne Zellzerstörung annehmen.

## E. ZUSAMMENFASSUNG

Die 5-Hydroxytryptamin-Aufnahme durch menschliche Thrombozyten stellt in vitro einen aktiven, spezifischen Prozeß dar, der bei Verwendung des Inkubationsmediums nach GAINTNER (1962) nach ca. einer halben Stunde zu einer Sättigung führt; die Reaktion folgt im zeitlichen Beginn einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik mit einer MICHAELIS-Konstante von $7,5 \times 10^{-7}$ M. 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) hemmen diese Serotonin-Aufnahme nicht-kompetitiv; es beträgt dabei die Inhibitorkonstante $K_I$ für D 176 $1,2 \times 10^{-4}$ M; D 178 zeigt mit einem $K_I$ von $1,3 \times 10^{-5}$ M eine 10-mal stärkere Hemmpotenz.

Beide Substanzen induzieren in höheren als für die Hemmung benötigten Komzentrationen zuerst eine 5-HT-Ausschüttung aus den Thrombozyten, der bei noch höheren Wirkstoffkonzentrationen eine begleitende Freisetzung der Adeninnukleotide Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) folgt. Auch bei der Induktion dieser "Freisetzungsreaktion" ist das Butylderivat etwa 10-fach stärker wirksam als das Methylderivat des 1-Aminoadamantans. Die durch D 176 und D 178 ausgelöste "Freisetzungsreaktion" ist zeit- und temperaturabhängig. Ein Maximum an frei-

gesetzten Substanzen wird bei niedrigen Konzentrationen nach 20 - 30 Minuten, bei höheren nach 10 - 20 Minuten erreicht. Die erforderliche Mindesttemperatur liegt für D 176 bei ungefähr 30°C, für D 178 etwas tiefer.

Obwohl eine Energieabhängigkeit der Reaktion nicht nachgewiesen werden konnte, wurde die Möglichkeit einer die 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung bedingenden unspezifischen Zellschädigung durch die beiden Aminoadamantanabkömmlinge durch folgende Ergebnisse weitgehend ausgeschlossen: 1. Bei der Freisetzung durch D 176, und mit Einschränkung auch durch D 178, zeigen sich nur geringe LDH-Aktivitäten im Thrombozytenaußenraum. 2. Der Aspekt in der elektronenmikroskopischen Abbildung vermittelt bei D 178-behandelten Thrombozyten den Eindruck intakter Membranen und unterscheidet sich nicht von dem der Kontrolle. 3. Während der Freisetzung kommt es zu einem Verbrauch an ATP (ca 30 %). Der Quotient ATP/ADP, der in unbehandelten Thrombozyten 1,7 beträgt, unterscheidet sich von dem ATP/ADP-Verhältnis im Inkubationsmedium nach der Aminoadamantan-induzierten Freisetzung (1,0). Diese Befunde sind trotz des negativen Ausgangs der Hemmversuche des Energiestoffwechsels ein starker Hinweis dafür, daß 1-Amino-3-methyladamantan (D 176) und 1-Amino-3-butyladamantan (D 178) die

"Release-Reaktion" auslösen können.

## LITERATUR

BEHNKE, O.: An electron microscope study of the megacaryocyte of the rat bone marrow
J. Ultrastructural Research 24, S. 412-433 (1967)

BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse
Band I, 2. Auflage (1970)
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

BERNEIS, K.H., DA PRADA, M., PLETSCHER, A.: Micelle formation between 5-HT and adenosine triphosphate in platelet storage organelles
Science 165, S. 913-914 (1969)

BERNEIS, K.H., PLETSCHER, A., DA PRADA, M.: Phase separation in solutions of noradrenaline and adenosine triphosphate: influence of bivalent cations and drugs
Br. J. Pharmac. 39, S. 382-389 (1970)

BIZZOZERO, G. (1882): ziiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 3
Academic Press, New York and London

BORN, G.V.R.: Adenosine triphosphate in blood platelets
Biochemical Journal 62, 33P (1956)

BORN, G.V.R., INGRAM, G.I.C., STACEY, R.S.: The relationship between 5-hydroxytryptamine and adenosine triphosphate in blood platelets
Br, J. Pharmac. + Chemoth. 13, S. 62-64 (1958)

BORN, G.V.R., GILLSON, R.E.: Studies on the uptake of 5-HT by blood platelets
J. Physiol. 146, S. 472-491 (1959)

BORN, G.V.R., SMITH, J.B.: Uptake, metabolism and release of ($^3$H)-adrenaline by human blood platelets
Br. J. Pharmac. 39, S. 765-778 (1970)

BRAY, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter
Analytical Biochemistry 1, S. 279-285 (1960)

BUCZKO, W., DE GAETANO, G., GARATTINI, S.: Effect of fenfluramine on 5-hydroxytryptamine uptake and release by rat blood platelets
Br. J. Pharmac. 53, S. 563-568 (1975)

DANIELCZYK, W.: Die Behandlung von akinetischen Krisen
Med. Welt 24, S. 1278-1282 (1973)

DA PRADA, M., PLETSCHER, A.: Isolated 5-hydroxytryptamine organelles of rabbit blood platelets: physiological properties and drug-induced changes
Br. J. Pharmac. 34, S. 591-597 (1968)

DA PRADA, M., PLETSCHER, A., TRANZER, J.P., KNUCHEL, H.: Action of reserpine on subcellular 5-hydroxytryptamine organelles of blood platelets
Life Science part I/7, S. 477-480 (1968)

DA PRADA, M., TRANZER, J.P., PLETSCHER, A.: Storage of 5-HT in human blood platelets
Experientia 28(11), S. 1328-1329 (1972(b)

DAVIES, W.L., GRUNERT, R.R., HAFF, R.F., MC GAHEN, J.W., NEUMAYER, E.M., PAULSHOCK, M., WATTS, J.C., WOOD, T.R., HERMANN, E.C., HOFFMANN, C.E.:
Antiviral activity of 1-adamantanamine
Science 144, S. 862-863 (1964)

DAY, H.J., HOLMSEN, H., HOWIG, T.: Subcellular particles of human platelets. A biochemical and electron-microscopic study with particular reference to the influence of fractionation techniques
Scand. J. Haemat. 8 (Suppl.): 7 (1969)

DEKHUYZEN (1901): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 1
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

DIXON, M.: The determination of enzyme inhibitor constants
Biochemical Journal 55, S. 170 (1953)

DONNÉ (1842): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 1
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

EDER, M., GEDIGK, P.: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie
29. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1974)

ERSPAMER (1952): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 274
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

GAARDER, A., JONSON, J., LALANDS, S., HELLEM, A.J., OWREN, P.A.: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets
Nature (London) 192, S. 531-532 (1961)

GALBRAIGHT, W.A., OXFORD, J.S., SCHILD. G.C., WATSON, G.I.: Protective effect of 1-adamantane hydrochloride on influenza $A_2$ infections in the family environment
Lancet 15, S. 1026-1028 (1969)

GAINTNER, J.R., JACKSON, D.P., MAYNERT, E.W.: The action of thrombin on platelet 5-hydroxytryptamine
Bullet of the Johns Hopkins Hospital 111, S. 185 (1962)

GOODE, D.J., MELTZER, H.Y.: Cytotoxic effects of imipramine on platelets
Biochemical Pharmacology 23, S. 2629-2635 (1974)

GRELAK, R.P., CLARK, R., STUMP, J.M., VERNIER, V.G.: Amantadine -dopamine interaction: possible mode of action in Parkinsonism
Science 169, S. 203-204 (1970)

GRETTE, K.: Studies on the mechanism of thrombin catalyzed hemostatic reactions in blood platelets
Acta Physiol. Scand. (Suppl.): 195 (1962)

HAACKE, U., WESEMANN, W.: Induction of the platelet release reaction by 1.3-dimethyl-5-aminoadamantane, a new adamantane derivative
Thromb. Diathes. haemorrh. 37(1), S. 62-72 (1977)

HARDISTY, R.M., STACEY, R.S.: 5-hydroxytryptamine in normal human blood platelets
J. Physiol. 130, S. 711-720 (1955)

HELLEM, A.J. (1960): zitiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 5
Academic Press, New York and London

HOLMSEN, H., HOLMSEN, I., BERNHARDSEN, A.: Microdetermination of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate in plasma with the firefly luciferase system
Analytical Biochemistry 17, S. 456-473 (1966)

HOLMSEN, H., DAY, H.J.: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. VI. Subcellular localisation of nucleotide pools with different function in the platelet release reaction
Biochimica et Biophysica Acta 186, S. 254-266 (1969)

HOLMSEN, H., DAY, H.J., STORMORKEN, H.: The blood platelet release reaction
Scand. J. Haemat. Suppl. 8 (1969)

HOLMSEN, H., DAY, H.J.: The selectivity of the thrombin induced platelet release reaction: subcellular localisation of released and restained constituents
J. Lab. + Clin. Med. 95, S. 840-854 (1970)

HOLMSEN, H., STORM, E., DAY, H.J.: Determination of ATP and ADP in blood platelets. A modification of the firefly luciferase assay for plasma
Analytical Biochemistry 46, S. 489-501 (1971)

HOLMSEN, H., DAY, H.J. (1971): zitiert nach O'BRIEN, I.R. (ed.): Clinics in haematology
Vol. 1,2, W.B. Saunders, London, Philadelphia, Toronto (1972)

HOLMSEN, H., OSTVOLD, A.C., DAY, H.J.: Behaviour of endogenous and newly absorbed serotonin in the platelet release reaction
Biochemical Pharmacology 22, S. 2599-2608 (1973)

KOWALSKI, E., KOPEC, M., WEGRZYNOWICZ, Z.: zitiert nach KOWALSKI, E., NIEWIAROWSKI, S.: Biochemistry of blood platelets (1967), S. 4
Academic Press, London and New York

LEMMER, B.: Effects of amantadine and amphetamine on serotonin uptake and release by human blood platelets
Eur. J. Pharmac. 21(2), S. 183-188 (1973)

LINEWEAVER, H., BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants
J. Am. Chem. Soc. 56, S. 658-666 (1934)

MAASSAB, H.F., COCHRAN, K.W.: Rubella virus: inhibition in vitro by amantadine hydrochloride
Science 145, S. 1443 (1964)

MASSINI, P.: Specific activity of $^{14}C$-labelled serotonin released from human blood platelets
Experientia 26, S. 87 (1970)

MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

MÜRER, E.H., DAY, H.J., LIEBERMANN, J.E.: Metabolic aspects of the secretion of stored compounds from blood platelets. III. Effect of NaF on washed platelets
Biochimica et Biophysica Acta 362, S. 266-275 (1974)

O'CONNOR und ZUCKER (1912): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 274
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

OSLER, W. (1847): zitiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 2
Academic Press, New York and London

PAASONEN, M.K., PLETSCHER, A.: Increase of free 5-hydroxytryptamine in blood plasma by reserpine and a benzoquinoline derivative
Experientia 15, S.477-479 (1959)

PAASONEN, M.K. (1964): zitiert nach PAASONEN, M.K., ATHEE, L., SOLATUNTURI, E.: Blood platelets as a model for monoaminergic neurons, S. 273
Progr. Brain Res. 34, S. 269-279 (1971)

PAASONEN, M.K., ATHEE. L., SOLATUNTURI, E.: Blood platelets as a model for monoaminergic neurons
Progr. Brain Res. 34, S. 269-279 (1971)

PIPER, W.: Innere Medizin (1974), S. 418/419
Springer Verlag Heidelberg

PLETSCHER, A., TRANZER, J.P.: Action of reserpine and imipramine on intracellular storage of 5-hydroxy-tryptamine in blood platelets
Experientia 23, S. 289-291 (1967)

PLETSCHER, A.: Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Br. J. Pharmac. + Chemoth. 32, S. 1-16 (1968)

PLETSCHER, A., DA PRADA, M., BERNEIS, K.H., TRANZER, J.P.: New aspects on the storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Experientia 27, S. 993-1002 (1971)

RAPPORT, M.: Serum vasoconstrictor (Serotonin). V. The presence of creatinin in the complex: a proposed study of the vasoconstrictor principle
J. Biol. Chem. 180, S. 961-969 (1948)

REBUCK, J.W., RIDDLE, J.M., BROWN, M.G., JOHNSON, S.A., MONTO, R.W. (1961): aus "The Blood Platelets" (S.A. Johnson et al., eds). Little Brown, Boston, Mass.

SCATTON, B., CHERAMY, A., BESSON, M.J., GLOWINSKY, J.: Increased synthesis and release of dopamine in the striatum of the rat after adamantanamine-treatment
Eur. J. Pharmac. 13, S. 131-133 (1970)

SCHWAB, R.S., ALBERT, C., DAVID, C., YONG, R.R.: Amantadine in the treatment of Parkinson's disease
J. Am. Med. Ass. 208, S. 1168-1170 (1969)

STACEY, R.S.: Uptake of 5-hydroxytryptamine by platelets
Br. J. Pharmac. 16, S. 284-295 (1961)

STÖLTZING, H.: Einfluß von Aminoadamantanen auf Transport und Speicherung von 5-HT und Adeninnukleotiden in menschlichen Thrombozyten
Dissertation aus dem Physiologisch-Chemischen Institut Marburg (1977)

SZABADOS, L., MESTER, L.: Accelerated uptake of 5-hydroxytryptamine by human blood platelets enriched in a sialic acid 148, S. 335-336 (1975)
Biochemical Journal

TRANZER, J.P., DA PRADA, M., PLETSCHER, A.: Ultrastructural localisation of 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Nature 212, S. 1574-1575 (1966)

TRANZER, J.P., PLETSCHER, A., DA PRADA, M.: Speicherung von 5-Hydroxytryptamin in submikroskopischen Organellen der Blutplättchen
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 24, C 108- C 110 (1966(b)

TRANZER, J.P., DA PRADA, M., PLETSCHER, A.: Electron microscopic study of the storage site of the 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Adv. in Pharmac. part A 6, S. 125-128 (1967)

WESEMANN, W., SCHOLLMEYER, J.D.: Biochemical effects of adamantanamines, a new class of drugs with anti-parkinson activity
Agents and Actions 3, S. 195 (1973)

WESEMANN, W., WILDENHAHN, G.: Electrical and drug induced release of 5-HT from isolated nerve endings
5th Internat. Meeting of the I.S.N. (1975)
Abstr. Nr. 39

Wildenhahn, G.: Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung des Serotonins in Synaptosomen
Dissertation aus dem Physiologisch-Chemischen Institut Marburg (1976)

WOLPERS, C., RUSKA, H. (1934): zitiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 4
Academic Press, New York and London

ZIMMERMANN (1847): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 1
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

Ich möchte Herrn Prof. Wesemann an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas und die mir bei der Arbeit geleistete Hilfestellung danken.

Herzlichen Dank auch den Mitarbeitern des Labors Prof. Wesemann, insbesondere Frau Süwer für Ratschläge und Hilfe und Herrn Stachora für das Fotographieren der Abbildungen.

## Lebenslauf

Ich wurde am 26.03.1952 als viertes Kind des Lehrerehepaars Karl und Margarete Muschalek (geb. Kurowski) in Bochum-Linden geboren. Nach der Grundschule besuchte ich ab 1962 das neusprachliche Theodor-Körner-Gymnasium in Bochum-Dahlhausen. Nach 1-jährigem Schulaufenthalt in Kalifornien während der Unterprima legte ich 1970 die Reifeprüfung in Bochum ab. Das Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1970 an der Philipps-Universität in Marburg. Nach dem Vorphysikum im Sommersemester 1971 und dem Physikum im Sommersemester 1973 bestand ich im Dezember 1976 das Staatsexamen.

Ab dem 1.4.1977 war ich 5 Monate in der Augenklinik als Medizinalassistentin tätig, zur Zeit arbeite ich in der Medizinischen Poliklinik.

Gabriele Muschalek

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Amon, Prof. Aurich, Prof. Aziz, Prof. Baltzer, Dr. Börngen, Prof. Bode, Prof. Braasch, Prof. Buchholz, Prof. Castenholz, Prof. Daume, Prof. Dehnicke, Prof. Dimroth, Prof. Dittrich, Prof. Dombrowski, Prof. Eissner, Prof. Egbring, Prof. Eschenbach, Prof. Exner, Dr. Frank, Dr. Frenzel, Prof. Friedrich, Prof. Gallwitz, Prof. Ganz, Prof. Gerdes, Dr. Glanz, Dr. Gloor, Prof. Golenhofen, Prof. Haberich, Prof. Hamelmann, Prof. Hardewig, Prof. Havemann, Prof. Hensel, Prof. Hering, Prof. Hess, Prof. Hildebrandt, Prof. Hilgermann, Prof. Hort, Prof. Huch, Prof. Jacob, Prof. Kaffarnik, Prof. Kalbfleisch, Prof. Karlson, Prof. Klaus, Prof. Kleinsasser, Prof. Koecke, Prof. Koransky, Prof. Lange, Dr. Langer, Prof. Lauer, Prof. Lütcke, Prof. Mannheim, Prof. Maroske, Prof. Martini, Prof. Neurath, Prof. Oepen, Prof. Petry, Prof. Pots, Prof. Remschmidt, Prof. Richter (Phys.), Prof. Richter (Chir.), Prof. Riecken, Prof. Rodeck, Prof. Rohen, Prof. Sachtschabel, Prof. Schiff, Prof. Schmid, Prof. Schmitz-Moormann, Prof. Schneider, Prof. Seidel, Prof. Siegert, Prof. Straub, Prof. Thoenes, Prof. Wehrmeyer, Prof. Welge-Lüßen, Prof. Wendt, Prof. Wesemann, Prof. Wiegand, Prof. Willenbockel